REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN DER GLUCOSE-1-PHOSPHAT-KINASE

PETER EYER

1960

AUS DEM PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. Dr. Th. BÜCHER

REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN DER GLUCOSE-1-PHOSPHAT-KINASE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

PETER EYER
aus München

München 1968

LEIDIG-Druck, 8 München-2, Dachauerstr. 46/I, Tel. 59 21 24

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstattter: Professor Dr. D. PETTE
Mitberichterstatter: Professor Dr. Dr. Th. BÜCHER
Dekan: Professor Dr. F. HOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 2. 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit

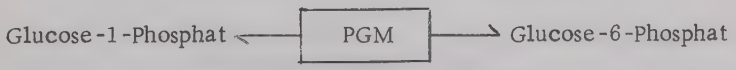
INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	7
	Die zentrale Stellung von Glucose-6-Phosphat und Glucose-1-Phosphat im Kohlenhydratstoffwechsel	7
	Phosphoglucomutase	7
	Glucose-1, 6-Diphosphat	10
	Glucose-1-Phosphat-Kinase	10
B	METHODIK	13
	Möglichkeiten für eine Aktivitätsbestimmung der Glucose-1-Phosphat-Kinase	13
	Durchführung der Aktivitätsbestimmung im Phosphoglucomutase-Beschleunigungstest	16
	Durchführung der G1PK-Aktivitätsbestimmung über die Messung des gebildeten ADP	19
	Durchführung der Aktivitätsbestimmung von Fructose-6-Phosphat-Kinase	20
	Sedimentationstechnik	20
C	ERGEBNISSE	22
	1. Aufstellung einer Eichkurve zur G16P-Bestimmung	22
	2. Reinigung der G1PK aus Kaninchenmuskel	22
	3. Versuch zur Trennung von G1PK- und F6PK-Aktivität	25
	4. Eigenschaften der G1PK	28
	a) Substrat-Affinitäten	28
	b) Magnesium-Abhängigkeit	29
	c) Nucleotid-Spezifität	29
	d) Hemmung der G1PK durch ATP in Abhängigkeit vom pH und der G1P-Konzentration	32
	e) Kinetische Modulation der G1PK durch Effektoren	37
D	DISKUSSION	46
E	ZUSAMMENFASSUNG	53
F	LITERATURVERZEICHNIS	56

Die zentrale Stellung von Glucose-6-Phosphat und Glucose-1-Phosphat im Kohlenhydratstoffwechsel

Im Netz der Stoffwechselvorgänge beim Auf- und Abbau der Kohlenhydrate bildet Glucose-6-Phosphat gleichsam einen "Knotenpunkt". In tierischen Zellen nimmt der entscheidende Stoffwechsel der Glykogenolyse und Glykolyse sowie der Gluconeogenese, Glucose-Phosphorylierung und Glykogensynthese den Weg über die Stufe des Glucose-6-Phosphats. Von diesem Substrat geht die Glucose-Freisetzung aus. Ebenso nimmt die Glucose-Oxydation, die weiter in den Pentose-Phosphat-Zyklus führt, hier ihren Ausgang. Die schematische Darstellung in Abb. 1 zeigt die zentrale Stellung des Glucose-6-Phosphats im Kohlenhydratstoffwechsel. In diesem Schema wird darüber hinaus die Bedeutung des Glucose-1-Phosphats, eines weiteren "Knotenpunkts" im Kohlenhydratstoffwechsel, ersichtlich. Das Glucose-1-Phosphat ist primäres Spaltprodukt beim Glykogenabbau. Es ist andererseits aber auch Ausgangsprodukt für die Synthese des Glykogens. Diese erfolgt über die Aktivierung des Glucose-1-Phosphats zu Uridin-Diphosphat-Glucose mit nachfolgendem Glucose-Transfer. Über diese Stufe erfolgt in gleicher Weise die Übertragung der Glucose zur Disaccharid-Synthese. Schließlich entstehen von hier aus - als Folge einer C_4-Epimerisierung - Galaktose, oder - als Ergebnis einer C_6-Oxydation - Glucuronsäure.

Phosphoglucomutase (PGM):



Indirekt, zum Teil auch direkt, stehen all diese Reaktionen in Verbindung mit dem Glucose-6-Phosphat. Diese Verbindung wird hergestellt durch die Phosphoglucomutase, welche Glucose-6-Phosphat und Glucose-1-Phosphat zueinander ins Gleichgewicht setzt. Die Phosphoglucomutase verbindet damit alle Reaktionen, die von den genannten "Knotenpunkten", Glucose-6-Phosphat und Glucose-1-Phosphat, ihren Ausgang nehmen bzw. zu ihnen hinführen.

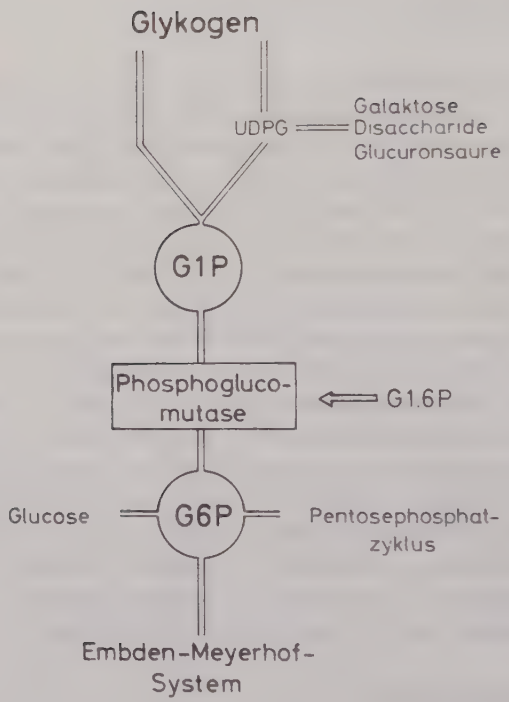


Abb. 1 Die zentrale Stellung der Phosphoglucomutase bei der Zusammenschaltung von Glykogen- und Glucose-Stoffwechsel

Das in Abb. 1 gezeigte Stoffwechselschema hebt die zentrale Stellung der Phosphoglucomutase hervor. Im energieliefernden Stoffwechsel hat diese Reaktion primäre Bedeutung als verbindendes Glied von Glykogenolyse und Glykolyse. Entscheidend ist das für solche Gewebe, die ihre Energie in erster Linie aus der Glykogenolyse beziehen. Ein Beispiel hierfür sind die sogenannten "phasischen" Muskeln mit bevorzugt anaerobem Aktionsstoffwechsel. In Muskeln dieses Typs finden sich auffällig niedrige Aktivitäten der Hexokinase. Die Anlieferung von Glucose-6-Phosphat für die Glykolyse erfolgt hier fast ausschließlich über die Phosphoglucomutase-Reaktion (1, 2). Unter zellphysiologischem Aspekt stellt sich die Frage, inwieweit die von der Phosphoglucomutase katalysierte Reaktion neben ihrer Bedeutung für die Koordination verschiedener Stoffwechselwege auch regulatorische Funktion hat bzw. selbst einer Regulation unterliegt. Die Möglichkeit einer wirksamen Regulation ergibt sich aus dem Reaktionsmechanismus, der in Abb. 2 schematisch wiedergegeben ist. Grundlage für die Klarstellung des Reaktionsmechanismus durch NAJJAR und PULLMAN (3) war die Entdeckung von LELOIR et al., daß Glucose-1,6-Diphosphat Cosubstrat der Phosphoglucomutase ist (4).

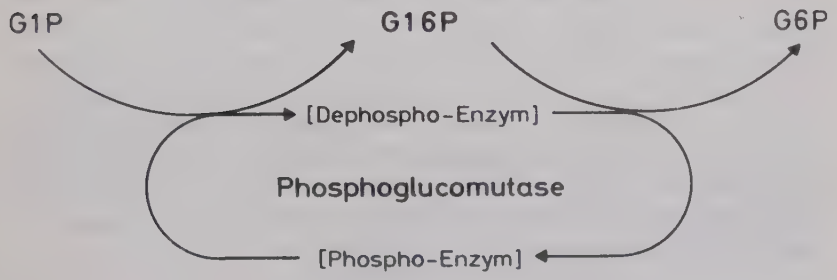


Abb. 2 Mechanismus der Phosphoglucomutase-Reaktion nach NAJJAR et al. (3)

Glucose-1,6-Diphosphat (G16P):

Glucose-1,6-Diphosphat ist Reaktionspartner in der Phosphoglucomutase-Reaktion. Es reagiert mit der Phosphoglucomutase und phosphoryliert dadurch das Enzym. Dieses ist aktiviert und überträgt sein Phosphat auf Glucose-1-Phosphat. Aus dem Glucose-1-Phosphat entsteht dabei Glucose-1,6-Diphosphat. Das dephosphorylierte Enzym (Dephosphoenzym) wird durch Übertragung des C_1-Phosphats von Glucose-1,6-Diphosphat rephosphoryliert. Aus dem Cosubstrat entsteht nunmehr das Reaktionsprodukt Glucose-6-Phosphat. Im Prinzip wird bei dieser Umesterung das Substrat im Phosphataustausch mit dem Enzym zunächst zum Cosubstrat und im zweiten Schritt zum Endprodukt. Nimmt die Reaktion, wie aus Abb. 2 hervorgeht, ihren Ausgang von der aktiven Phosphoglucomutase (Phosphoenzym), so entsteht das Cosubstrat direkt aus Glucose-1-Phosphat. Im Fall der inaktiven Phosphoglucomutase (Dephosphoenzym) ist dagegen die Anwesenheit des Cosubstrats Voraussetzung, um über die Phosphorylierung des Enzyms die Umwandlung von Glucose-1-Phosphat in Glucose-6-Phosphat in Gang zu bringen. Tatsächlich liegt die Phosphoglucomutase in Zellextrakten nur zum Teil in phosphorylierter Form vor. In Extrakten aus ruhendem Skelettmuskel überwiegt die inaktive Dephosphoform des Enzyms. Die Abb. 3 illustriert diesen Befund. Dargestellt ist die im zusammengesetzten optischen Test registrierte Aktivität der Phosphoglucomutase über die Umsetzung von Glucose-1-Phosphat in Glucose-6-Phosphat. Die Reaktion wird im ruhenden M. gastrocnemius der Ratte gemessen. Nach Zusatz von Glucose-1-Phosphat und Extrakt ist der Umsatz gering. Erst in Gegenwart von Glucose-1,6-Diphosphat läuft die Reaktion mit maximaler Geschwindigkeit ab. Das Experiment kann die Bedeutung von Glucose-1,6-Diphosphat als Cosubstrat zwar nicht sichtbar machen, es beweist aber die Rolle von Glucose-1,6-Diphosphat als eines auslösenden Faktors für das In-Gang-Kommen der Phosphoglucomutase-abhängigen Katalyse. Damit wird in Abb. 3 die Regulierbarkeit der Phosphoglucomutase-Reaktion demonstriert. Sie gründet sich auf die Glucose-1,6-Diphosphat-abhängige Stimulierung des Enzyms.

Glucose-1-Phosphat-Kinase (G1PK):

Glucose-1-Phosphat + ATP —[G1PK]→ Glucose-1,6-Diphosphat + ADP

Die Annahme einer von Glucose-1,6-Diphosphat abhängigen Steuerung der Phosphoglucomutase-Aktivität in vivo setzt eine Regulation des Glucose-1,6-Diphosphat-Spiegels in der Zelle voraus. Eine solche Regulation kann in

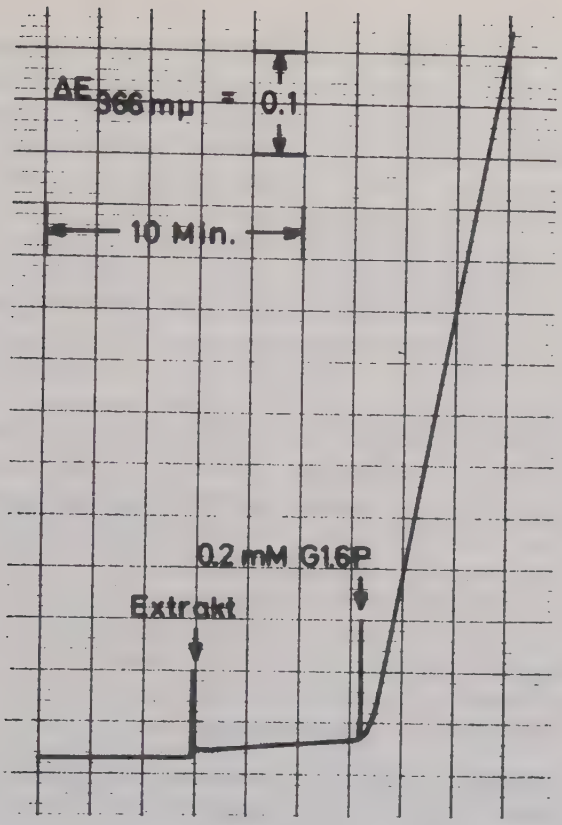


Abb. 3 Reproduktion einer Original-Testkurve: Aktivitätsbestimmung der Phosphoglucomutase im ruhenden M. gastrocnemius der Ratte. Nembutal-Narkose, Freilegung des M. gastrocnemius, Gefrierstop mit Isopentan (-65° C), Homogenisation im Ultra-Turrax (Janke u. Kunkel KG, Stauffen, Typ 18/2) im 20fachen Volumen eines 0,1 M K/Na-Phosphat-Puffers pH = 7,2 bei 0° C. 25 Minuten Zentrifugation in der Spinco-Ultrazentrifuge L 50 und Aktivitätsbestimmung der Phosphoglucomutase im zusammengesetzten optischen Test (vergl. Methodik, S.17). Start mit Extrakt. Nach 6 1/2 Minuten Bestimmung der Maximalaktivität durch Zusatz von 0,2 mM G16P.

gleicher Weise durch Zufluß und Abfluß erfolgen. In der Tat sind entsprechende Enzyme für Bildung und Abbau des Glucose-1,6-Diphosphats bekannt. Eine Glucose-1,6-Diphosphat spaltende Phosphatase wurde kürzlich von HASHIMOTO beschrieben (5). Eine Kinase, welche ATP-abhängig Glucose-1-Phosphat zu Glucose-1,6-Diphosphat phosphoryliert, ist bereits seit 1949 bekannt. Das Enzym wurde von PALADINI et al. 4fach aus Kaninchenmuskel angereichert (6). Es ist merkwürdig, daß dieses Enzym bisher nicht in Zusammenhang mit einer Regulation der Phosphoglucomutase gebracht wurde. Im Schrifttum finden sich keinerlei Hinweise auf eine solche Zuordnung, und die Publikation von PALADINI et al. ist bisher die einzige Mitteilung über die Glucose-1-Phosphat-Kinase in der Literatur. Dabei liegt es nahe, diesem Enzym regulative Bedeutung beizumessen. Über die Phosphorylierung von Glucose-1-Phosphat vermag Glucose-1-Phosphat-Kinase den Spiegel des Glucose-1,6-Diphosphats einzustellen und damit die Aktivität der Phosphoglucomutase zu steuern. Die Bedeutung dieses Regulationsmechanismus ergibt sich aus der Tatsache, daß eine Reaktion betroffen wird, die zwei Hauptwege des energieliefernden Stoffwechsels - Glykogenolyse und Glykolyse - miteinander verbindet. Das Prinzip der Regelung ist zellphysiologisch von besonderem Interesse und kann als Regulierung einer Verstärkerfunktion gedeutet werden. Verstärker ist das Glucose-1,6-Diphosphat als Aktivator der Phosphoglucomutase. Reguliert wird dieser "Verstärker" durch die Wirkung der Glucose-1-Phosphat-Kinase.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Bedeutung der Glucose-1-Phosphat-Kinase als Regulatorenzym für die Phosphoglucomutase-Reaktion und damit für den energieliefernden Stoffwechsel klarzustellen. Die Untersuchungen gründen sich auf den Nachweis und die hochgradige Reinigung der Glucose-1-Phosphat-Kinase aus Kaninchenmuskel. Die Reinigung des Enzyms und seine Identifizierung werden beschrieben. Weitere Studien am Enzym führen zum Nachweis allosterischer Eigenschaften und unterstreichen damit seine regulative Funktion im Stoffwechsel.

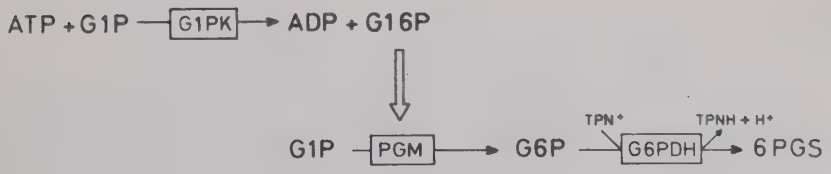
Möglichkeiten für eine Aktivitätsbestimmung der Glucose-1-Phosphat-Kinase

Glucose-1-Phosphat-Kinase katalysiert folgende Reaktion:
Glucose-1-Phosphat + ATP = Glucose-1, 6-Diphosphat + ADP.
Für den Aktivitätsnachweis bieten sich zwei Möglichkeiten an:

1. Die Messung des in der Zeiteinheit gebildeten Glucose-1, 6-Diphosphats (Test 1).
2. Die Messung des in der Zeiteinheit gebildeten Adenosindiphosphats (Test 2).

Die Aktivitätsbestimmungen erfolgen nach dem Prinzip des zusammengesetzten optischen Tests (7).

Test 1



Die Bestimmung von Glucose-1, 6-Diphosphat (G16P) erfolgt in der Phosphoglucomutase-Reaktion (PGM). Dabei wird in einem standardisierten PGM-Aktivitätstest die Konzentration des G16P über die Stimulierung der PGM gemessen. Abb. 4 zeigt das Prinzip dieser Methode. In Abwesenheit von G16P ist der von der Dephosphoform der PGM katalysierte Substratumsatz praktisch gleich Null (Kurve 2). Das in Anwesenheit von ATP und Glucose-1-Phosphat-Kinase (G1PK) enzymatisch gebildete G16P bewirkt die Stimulierung der PGM (Kurve 1). Die Stimulierung der PGM, die sich im Zuwachs des von ihr katalysierten Substratumsatzes ausdrückt, ist ein Maß für die

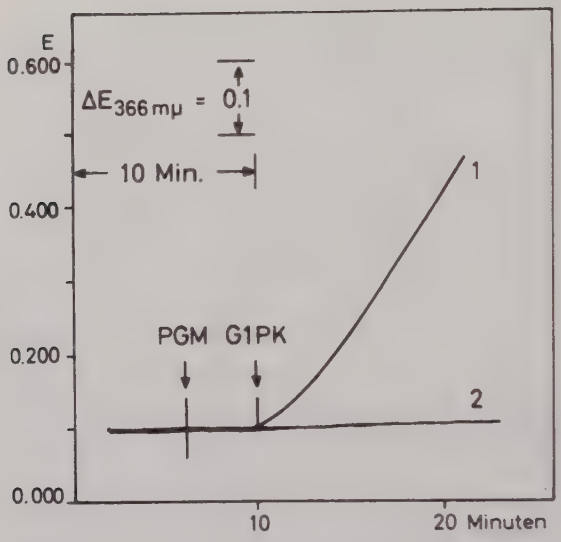


Abb. 4 Reproduktion einer Original-Testkurve: Aktivitätsbestimmung der Phosphoglucomutase; Abhängigkeit ihrer Aktivität von der enzymatischen G16P-Bildung. Die PGM-Aktivität wird über die TPN-Reduktion im zusammengesetzten optischen Test bei 366 mμ in einer 1 cm Küvette bei 25°C bestimmt. Testzusammensetzung: 50 mM Tra + 5 mM EDTA (pH 7,6), 8 mM $MgCl_2$, 0,4 mM TPN, 2 mM synthetisches G1P, 20 μg G6PDH/ml und 0,2 μg PGM/ml. Beide Enzyme werden gegen 100 mM Imidazolpuffer (pH 7,6) dialysiert. Die Reaktion wird gestartet mit PGM. Der Reaktionsablauf ist praktisch gleich Null (Kurve 2). Kurve 1 zeigt die Beschleunigung der Reaktion, die auf der enzymatischen G16P-Bildung nach Zugabe von G1PK und 0,2 mM ATP beruht.

gebildete G16P-Menge. Nach diesem Prinzip lassen sich Konzentrationsbestimmungen von G16P durchführen. In Abb. 4 ist erkennbar, daß die Geschwindigkeit der PGM-Reaktion nach Zusatz von G1PK in Abhängigkeit zur Zeit zunimmt. Das Anwachsen der Geschwindigkeit ist direkte Folge der zeitabhängigen G16P-Bildung in der G1PK-Reaktion. Methodisch ist in diesem Versuchsansatz freilich eine exakte Bestimmung der G16P-Bildung in der Zeiteinheit als Maß für die Aktivität der G1PK kaum möglich. Das Verfahren ist aber dennoch für die Aktivitätsbestimmung der G1PK anwendbar, wenn Meßreaktionen, d.h. G16P-Bildung, und Indikatorreaktion, d.h. Stimulierung der Phosphoglucomutase-Reaktion, voneinander getrennt werden. Dazu wird G1PK bzw. ein enzymhaltiger Extrakt mit Glucose-1-Phosphat (G1P) und ATP unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Nach einer definierten Zeit wird die Reaktion durch Hitzedenaturierung des Enzyms abgebrochen. In einer zweiten Reaktion wird das gebildete G16P im PGM-Beschleunigungstest gemessen. Voraussetzung für diese kinetische Substratbestimmung ist eine Standardisierung der PGM-Reaktion. Dann aber steht die meßbare Beschleunigung der PGM-Reaktion in direkter Beziehung zur G16P-Konzentration.

Abb. 5 zeigt unter standardisierten Bedingungen und bei konstanter PGM-Aktivität durch verschiedene G16P-Konzentrationen erzielte Beschleunigungen der PGM-Reaktion. Für die Registrierung der Testkurven wurde synthetisches, kristallines G16P in verschiedenen Mengen eingesetzt. Bei konstanter PGM-Menge nimmt die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender G16P-Konzentration zu und erreicht bei G16P-Sättigung der PGM einen maximalen Wert. Dieser Maximalwert, die Referenzgeschwindigkeit V_R, ist Bezugsgröße. Die unterhalb des Sättigungswertes bei beliebigen G16P-Konzentrationen bestimmten Geschwindigkeiten sind die Meßgrößen. Das Verhältnis der Meßgröße, d.h. der Geschwindigkeit V, zur Referenzgeschwindigkeit V_R ist Maß für die G16P-Konzentration. Da G1PK ein sehr niedriges Substratoptimum für ATP hat und durch höhere ATP-Konzentrationen gehemmt wird, muß die Meßreaktion bei relativ niedriger ATP-Konzentration ausgeführt werden. Zur Konstanthaltung der optimalen ATP-Konzentration im Test dient ein ATP-regenerierendes System, welches das in der Reaktion gebildete ADP wieder zu ATP phosphoryliert. Dazu dient Phosphoenolpyruvat, welches in der Pyruvat-Kinase-Reaktion Phosphat-Donator für ADP ist und dabei zu Pyruvat umgesetzt wird.

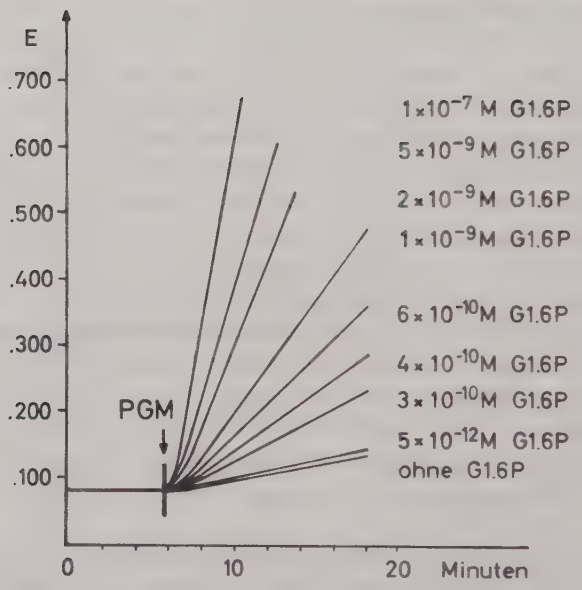


Abb. 5 G16P-abhängige Stimulierung der Phosphoglucomutase. Unter standardisierten Bedingungen (s. Methodik, S.16) und konstanter PGM-Menge wurden die jeweiligen Umsatzraten der PGM-Reaktion bei verschiedenen G16P-Konzentrationen gemessen.

Durchführung der Aktivitätsbestimmung im Phosphoglucomutase-Beschleunigungstest

Reaktionsansatz des Inkubationsmediums:

Das Volumen des Ansatzes beträgt 0,5 ml. Als Reaktionspuffer dient eine Lösung folgender Zusammensetzung:
100 mM Triäthanolamin (TRA), 10 mM Äthylendiamintetraacetat (EDTA), 16 mM $MgCl_2$. Das pH wird mit NaOH auf 7,6 eingestellt. Zu 0,25 ml

dieses Puffers werden 0,05 ml einer 500 mM G1P-Lösung, 0,01 ml einer 10 mM ATP-Lösung, 0,025 ml einer 100 mM Phosphoenolpyruvat (PEP)-Lösung und 5 µg Pyruvat-Kinase zugesetzt, die 2 Stunden lang gegen einen 100 mM Imidazol-Puffer vom pH = 7,6 dialysiert wurde. Abzüglich des Volumens des enzymhaltigen Extrakts wird mit quarzdestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 0,5 ml aufgefüllt. Als geeignete Reaktionsgefäße erwiesen sich verschließbare Mikrozentrifugenbecher aus Polyäthylen (Netheler und Hinz GmbH, Hamburg). Nach Start der Reaktion mit der G1PK-enthaltenden Lösung wird der Ansatz im Wasserbad bei 25°C inkubiert. Bei Bestimmung der G1PK-Aktivität in Muskelrohextrakten hat sich eine Inkubationsdauer von 10 Minuten bewährt, wenn dem Inkubationsmedium etwa 0,1 mg Extraktprotein zugesetzt wird. Die Reaktion wird durch 5-minütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad beendet. Nach Abkühlen im Eisbad wird das denaturierte Protein 2 Minuten lang in der Mikrozentrifuge "Eppendorf 3200" (Netheler und Hinz GmbH, Hamburg) abzentrifugiert. Im klaren Überstand der Zentrifugation wird ein Aliquot der Inkubationslösung, beispielsweise 0,05 ml, in den Phosphoglucomutase-Test eingesetzt.

Zusammensetzung des Phosphoglucomutase-Tests:

Als Testpuffer wird der oben beschriebene Reaktionspuffer verwendet. Davon werden 0,5 ml in den Test eingesetzt. Nach Zusatz der übrigen Substanzen wird mit quarzdestilliertem Wasser auf ein Testvolumen von 1,0 ml aufgefüllt. Die Konzentrationen im Test sind für die übrigen Substanzen: Triphosphopyridinnucleotid (TPN) = 0,4 mM, G1P (synthetisches Dikaliumsalz) = 2 mM, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) = 20 µg. Phosphoglucomutase (PGM) = 0,2 µg. Beide Enzyme wurden zur Entfernung von Ammonsulfat jeweils 2 Stunden gegen 100 mM Imidazolpuffer vom pH = 7,6 dialysiert. Die Reaktion wird durch Zusatz des in der Inkubationsreaktion gebildeten G16P gestartet, wobei zum Beispiel 0,05 ml des Überstandes, wie oben erwähnt, in den Test eingesetzt werden. Maximale Aktivität der PGM wird unter den Bedingungen dieses Tests nach Zugabe von 0,2 mM synthetischem G16P gemessen. Folgende Fehlerquellen müssen bei dieser Methode der G1PK-Aktivitätsbestimmung berücksichtigt werden:

a) Im Rohextrakt enthaltene G16P-Diesterasen können das in der Inkubationsreaktion gebildete G16P spalten.

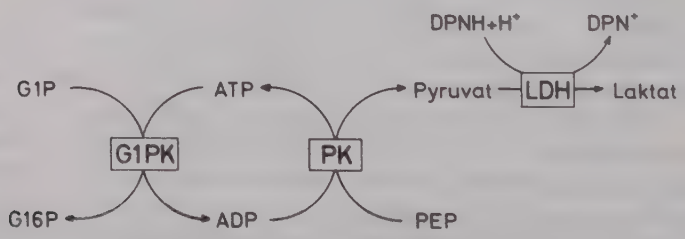
b) Da die G1PK-Aktivität aus der gebildeten G16P-Menge bestimmt wird, verfälscht bereits im Rohextrakt vorhandenes G16P das Ergebnis.

c) Im Testsystem können Spuren von G16P vorliegen. Hier kommen vor allem die auf enzymatischem Wege hergestellten G1P-Präparate in Betracht, die erheblich mit G16P verunreinigt sind (Durch Verwendung von reinem und synthetisch hergestelltem G1P kann dieser Fehler jedoch ausgeschlossen werden).

zu a):In einem getrennten Test kann die G16P-Diesterase-Aktivität berücksichtigt werden (5).

zu b) und c): Die bereits im Rohextrakt und im Testsystem vorliegende Menge an G16P kann in einem Parallelansatz bestimmt werden, wenn dem Inkubationsmedium hitzedenaturierter Rohextrakt zugesetzt wird. Dadurch kann das G16P, das nicht in der G1PK-Reaktion gebildet wird, bestimmt werden und dann bei der Aktivitätsberechnung der G1PK Berücksichtigung finden. Zur G16P-Bestimmung im Rohextrakt wird, wie bereits früher erwähnt, das Verhältnis der aktuellen Geschwindigkeit V zur Maximalgeschwindigkeit V_R berechnet. V und V_R können in einem einzigen Test bestimmt werden, indem nach einem Reaktionsablauf, der eine Extinktionszunahme von 0,3 nicht überschreiten soll, mit 0,2 mM synthetischem G16P die Maximalgeschwindigkeit der PGM ermittelt wird. Anhand einer Eichkurve läßt sich die G16P-Konzentration aus dem Quotienten V/V_R bestimmen. Die G1PK-Aktivität resultiert dann nach Abzug der G16P-Verunreinigung aus der während der Inkubationszeit gebildeten G16P-Menge.

Test 2



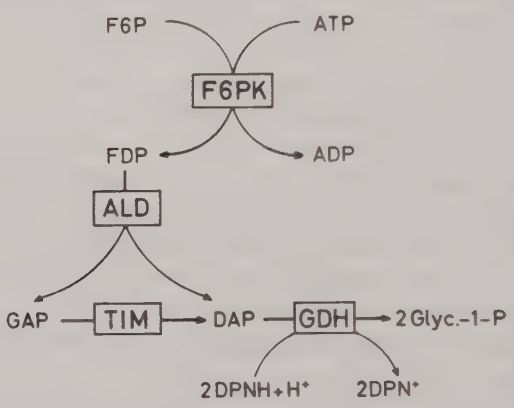
Eine zweite Möglichkeit, die G1PK-Aktivität zu bestimmen, bietet die Messung des in der Phosphorylierungsreaktion entstandenen ADPs. Dieses läßt sich im zusammengesetzten optischen Test sehr einfach über das Pyruvat-

Kinase/Lactat-Dehydrogenase-System erfassen. Diese Methode hat den Vorteil der wesentlich einfacheren Handhabung. Allerdings ist bei diesem System mit höherer Unspezifität zu rechnen, da nur bei hochgereinigten G1PK-Präparaten sichergestellt ist, daß das gebildete ADP tatsächlich aus der G1PK-Reaktion stammt. In ungereinigten Gewebsextrakten kann ADP aus ATP durch die Aktivität von ATPasen gebildet werden. Pyruvat kann aus PEP durch die Wirkung der alkalischen Phosphatase entstehen. Daneben kann ADP durch Einwirkung der Myokinase in ATP und AMP disproportioniert werden. Solche Fehlermöglichkeiten entfallen bei der G1PK-Bestimmung im kinetischen Test über die PGM-Beschleunigungsreaktion. Dieser Test bietet außerdem eine wesentlich höhere Empfindlichkeit des G1PK-Nachweises. Er erfordert allerdings einen höheren methodischen Aufwand.

Durchführung der G1PK-Aktivitätsbestimmung über die Messung des gebildeten ADP

Als Testpuffer werden 0,5 ml einer Lösung folgender Zusammensetzung verwendet: 100 mM Imidazol, 12 mM $MgCl_2$, pH = 7,6. Nach Zusatz der übrigen Substanzen wird mit quarzdestilliertem Wasser auf ein Testvolumen von 1,0 ml aufgefüllt. Die Konzentrationen im Test sind für die übrigen Substanzen:
red. Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) = 0,22 mM, Phosphoenolpyruvat (PEP) = 0,8 mM, G1P = 50 mM, ATP = 0,2 mM, 10 µg Pyruvat-Kinase und 1 µg Lactat-Dehydrogenase. Beide Enzyme wurden jeweils zwei Stunden gegen einen 100 mM Imidazolpuffer vom pH = 7,6 dialysiert. Nach Zusatz des enzymhaltigen Extrakts wird nach etwa 10 Minuten die eigentliche Meßreaktion durch Zugabe von G1P gestartet. So kann im 10-minütigen Vorlauf eine eventuell vorhandene Aktivität ATP- oder PEP-spaltender Enzyme ermittelt werden und bei der Berechnung der G1PK-Aktivität Berücksichtigung finden. Die Enzymaktivitäten werden grundsätzlich bei einer Reaktionstemperatur von 25° C bestimmt und in Internationalen Einheiten (I.E.) angegeben. Hierbei entspricht ein Substratumsatz von 10^{-6} Mol/Minute einer Einheit.
Bei Messungen der G1PK-Aktivität in Rohextrakten wird der PGM-Beschleunigungstest verwendet. Für Untersuchungen kinetischer Eigenschaften in hochgereinigten Systemen ist der leichter und schneller zu handhabende Test über die Bestimmung des entstehenden ADPs im PK/LDH-System vorzuziehen.

Durchführung der Aktivitätsbestimmung von Fructose-6-Phosphat-Kinase:



Der Test setzt sich aus einer Sequenz von vier hintereinandergeschalteten Reaktionen zusammen (7). Nach Art der in beiden Hilfsreaktionen und in der Indikatorreaktion angeordneten Enzyme erfolgt eine Umwandlung des in der Meßreaktion gebildeten Fructose-1,6-Diphosphats in L-Glycerin-1-Phosphat. Pro Phosphat-Übertragung werden zwei Äquivalente DPNH oxydiert.

Testzusammensetzung:
Als Puffer wird eine Lösung folgender Zusammensetzung verwendet: TRA = 100 mM, EDTA = 10 mM, $MgCl_2$ = 16 mM, pH = 7,6. Zu 0,5 ml dieses Puffers wird nach Zusatz der übrigen Substanzen quarzdestilliertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 1,0 ml gegeben. Die Konzentrationen im Test sind für die übrigen Substanzen:
red. Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) = 0,22 mM, ATP = 2 mM, Fructose-6-Phosphat (F6P) = 2 mM. Die Hilfsenzyme sind aus Kaninchenmuskel kristallisiert. Von Aldolase (ALD) werden 0,05 mg, von Triosephosphat-Isomerase (TIM) 0,001 mg und von Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase (GDH) 0,1 mg eingesetzt. Nach Zusatz des enzymhaltigen Extrakts wird die Reaktion mit F6P gestartet.

Sedimentationstechnik:

Die Untersuchung der Sedimentationseigenschaften der G1PK wird im linearen Saccharosegradienten durchgeführt. Die Methode gründet sich auf das von HOGEBOOM, MARTIN, AMES, De DUVE und Mitarb. angegebene Verfah-

ren (8, 9). Bei Verwendung von linearen Saccharose-Gradienten zur Untersuchung der Sedimentationseigenschaften von Makromolekülen sedimentieren diese unter der Einwirkung sehr hoher Beschleunigung in die ihrer Dichte entsprechende Bande des Saccharosegradienten. Der lineare Saccharosegradient von 5 - 20 % wird mit einer Gradientenmischmaschine hergestellt (10). Die Linearität des Gradienten wird refraktometrisch kontrolliert. Das Gesamtvolumen des Saccharosegradienten beträgt 4,55 ml (Ausschwingrotor SW 39, Spinco Ultrazentrifuge L 50). Unmittelbar vor Beginn der Zentrifugation werden 0,1 ml der Enzymlösung vorsichtig auf den Gradienten pipettiert. Das Enzym wurde vorher gegen das Medium, dessen Einfluß auf das Sedimentationsverhalten der G1PK untersucht werden soll, dialysiert. Im gleichen Medium ist auch der Saccharosegradient gelöst. Als Puffer wird 0,1 M Glycyl-Glycin (freie Base), dem 2 mM EDTA zugesetzt war, verwendet. Während der 5-stündigen Zentrifugation bei 175 000 g beträgt die Temperatur konstant + 3°C. Nach der Zentrifugation wird der Inhalt des Zentrifugenbechers (4,55 ml Saccharosegradient + 0,1 ml Enzymlösung) in 40 Fraktionen zu je 0,116 ml aufgeteilt. Der enzymatische Test erfolgt im unmittelbaren Anschluß an die Fraktionierung.

1.) Aufstellung einer Eichkurve zur G16P-Bestimmung:

Zum Erhalt einer Eichkurve wurde im standardisierten PGM-Aktivitätstest die Geschwindigkeit der PGM-Reaktion bei verschiedenen G16P-Konzentrationen gemessen. Die in die Tests eingesetzte PGM-Menge wurde konstant gehalten. Synthetisches G16P wurde in steigender Menge bis zur Sättigung der PGM zugesetzt. Die bei G16P-Sättigung gemessene Geschwindigkeit der PGM war die Referenzgeschwindigkeit V_R. Bei einer Substratkonzentration von 2 mM G1P wurde die maximale Geschwindigkeit in Gegenwart von 0,1 mM G16P erreicht. Alle unterhalb dieses Wertes gemessenen Geschwindigkeiten stehen in Abhängigkeit zur eingesetzten G16P-Konzentration. Die bei variierten G16P-Konzentrationen bestimmten Geschwindigkeiten V sind darum in Bezug auf V_R ein direktes Maß für die G16P-Konzentrationen. Bei Auftragung der jeweiligen Quotienten V/V_R gegen die G16P-Konzentrationen wird die in Abb. 6 wiedergegebene Eichkurve erhalten. Aus dieser Eichkurve läßt sich jede beliebige G16P-Menge aus der Größe des jeweils ermittelten Quotienten V/V_R ablesen, vorausgesetzt, daß die Konzentrationen unterhalb des Sättigungsbereiches der PGM für G16P liegen.

2.) Reinigung der G1PK aus Kaninchenmuskel:

Die Reinigung der G1PK aus Kaninchenmuskel geht der Reinigung der F6PK parallel. Bei der Reinigung von Fructose-6-Phosphat-Kinase (F6PK, E.C. 2.7.1.11.) findet sich im angereicherten Extrakt eine relativ hohe G1PK-Aktivität. Daher wurde bei der Reinigung der G1PK das von unserem Laboratorium für die F6PK bereits ausgearbeitete Verfahren angewendet (11, 12, 13, 14, 15).
Die gesamte Präparation und Enzymaufarbeitung wird bei Kühlraumtemperatur von 4 °C durchgeführt. Normal ernährte Kaninchen "Deutscher Widder" werden vollständig entblutet; nach Abhäuten und Eventeration werden die Extremitätenmuskeln, die langen Rückenmuskeln und die Mm. psoas fett- und bindegewebsarm abpräpariert. Sofort anschließend werden die Muskeln in einem mit Teflon beschichteten Fleischwolf zerkleinert und in ein vorgewogenes Gefäß mit 1 Liter Puffer gegeben. Der Puffer, der auch zur Extraktion verwendet wird, setzt sich folgendermaßen zusammen: Eine Lösung von 0,1 M KH_2PO_4 und 10 mM EDTA wird mit einer Lösung von 0,1 M

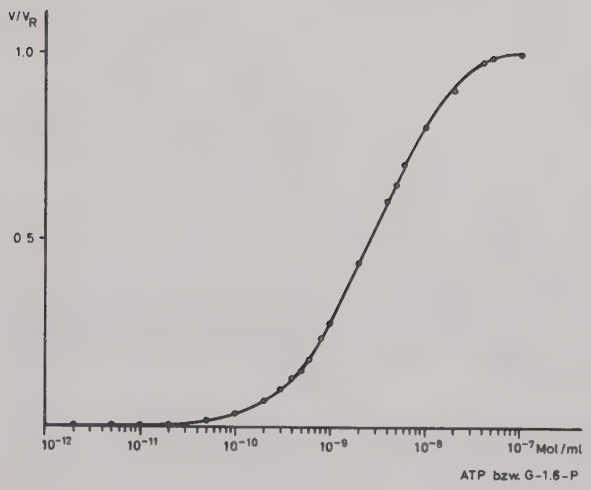


Abb. 6 Abhängigkeit der PGM-Umsatzrate von der G16P-Konzentration. Die Stimulierung der PGM wird durch den Quotienten V/V_R ausgedrückt und gegen die G16P-Konzentration aufgetragen. V stellt die bei der jeweiligen G16P-Konzentration und V_R die bei G16P-Sättigung gemessene Geschwindigkeit dar.

Na_2HPO_4 und 10 mM EDTA auf ein pH von 7,6 eingestellt. Die Muskelmasse wird gewogen und im 4-fachen Puffervolumen extrahiert. Zur Aktivitätsbestimmung wird eine kleine Probe entnommen. Unter kräftigem Rühren wird solange extrahiert, bis keine Aktivitätszunahme im Überstand einer Probezentrifugation mehr feststellbar ist. Das ist in der Regel nach 3 Stunden Extraktion der Fall. Während der gesamten Extraktion wird der pH-Wert automatisch mit einem pH-Staten (Radiometer Kopenhagen) durch Zugabe von 25 % NH_4OH auf 7,6 konstant gehalten. Anschließend wird der Extrakt durch einen Büchner-Trichter, der mit Nylon-Gaze einer Maschenweite von 0,05 mm belegt ist, in eine Saugflasche mit Wasserstrahlpumpen-Unterdruck filtriert. Nach Aktivitäts- und Proteinbestimmung wird der Extrakt einer fraktionierten Ammonsulfat-Aussalzung unterzogen.

Ammonsulfat-Fällung:
Unter ständigem Rühren wird über einen Salzstreuer kontinuierlich festes Ammonsulfat zugegeben. Das pH wird mit NH_4OH weiterhin konstant auf 7,6 gehalten. Aktivitätsbestimmungen in Probezentrifugationen werden laufend durchgeführt, und in den enteiweißten Überständen dieser Probezentrifugationen wird nach der KJELDAHL-Methode die Ammonsulfat-Konzentration bestimmt. Die Salzzugabe wird beendet, sobald die Enzymaktivität im Überstand abnimmt. Das ist der Fall bei einer Ammonsulfat-Konzentration von 1,5 M. Nun wird zentrifugiert, das Sediment verworfen und der Überstand erneut mit festem Ammonsulfat versetzt, bis das Enzym bei einer Ammonsulfat-Konzentration von 1,9 M zu ca. 90 % ausgefallen ist. Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Sediment in dem 1 : 1 mit dest. Wasser verdünnten Extraktionspuffer gelöst. Die Menge des Phosphatpuffers wird so bemessen, daß eine Proteinkonzentration von etwa 3 % resultiert.

Hitze-Fällung:
Das gelöste Präzipitat wird unter kräftigem Rühren für 20 Minuten in ein Wasserbad von 64° C gebracht. Hierbei wird ein großer Teil des Fremdproteins denaturiert. Nach Abkühlen im Eisbad wird das denaturierte Protein zentrifugiert. Im klaren Überstand der Zentrifugation finden sich ca. 75 % der ursprünglichen Enzymaktivität.

Chromatographie:
Das Enzym wird zweimal je 4 Stunden gegen einen 30 mM Phosphat-Puffer vom pH 7,3 dialysiert und anschließend auf einer DEAE-Sephadex-Anionen-Austauschersäule chromatographiert. Die ca. 1 m hohe Säule mit 4 cm Durchmesser ist mit etwa 1,2 Liter DEAE-Sephadex A 50 beschickt, das in 30 mM Phosphat-Puffer (pH 7,3) über 3 Tage aequilibriert wurde. Die Elution des Enzyms erfolgt mit Phosphat-Puffer (pH 7,3) in linear steigendem Konzentrationsgradienten. In einem Konzentrationsbereich von 60 - 100 mM Phosphat wird das Enzym in zwei Gipfeln vollständig eluiert. Da das Enzym in höherer Verdünnung (unter 0,1 % Protein) instabil ist, werden die enzymhaltigen Fraktionen vereinigt und auf einem Membranfiltergerät (Membranfilter Göttingen) unter 20 atü Stickstoff etwa auf das 20-fache eingeengt. Anschließend wird das Enzym gegen eine Lösung folgender Zusammensetzung dialysiert: 1,2 M Ammonsulfat, 50 mM Phosphat, 2 mM EDTA, pH 7,6. In dieser Form ist das Enzym mehrere Monate haltbar.

In Tabelle 1 werden die wichtigsten Schritte einer typischen G1PK-Präparation zusammengefaßt. In diesem Versuch konnte das Enzym um das 200-fache gereinigt werden. Die Gesamtausbeute - 40 mg Enzymprotein - betrug 16 % der ursprünglichen Enzymaktivität im Rohextrakt.

TABELLE 1

	Gesamtaktivität (I.E.)	Spez. Aktivität (I.E./mg Prot.)	Reinheitssteigerung
Muskelextrakt	170	0,003	
Sediment der Ammonsulfat-Fällung (1,5 - 1,9 M)	145	0,011	3,6
Überstand der Hitzefällung	125	0,17	15
Chromatographie	27	0,67	4

3.) Versuch zur Trennung von G1PK- und F6PK-Aktivität:

Während der Enzymreinigung zeigen G1PK- und F6PK-Aktivität identisches Verhalten. Das Verhältnis der beiden Enzymaktivitäten ist auffällig konstant. Diese Konstanz des Aktivitätsverhältnisses wird offensichtlich, wenn in Tab. 2 die beiden Enzymaktivitäten in 9 verschiedenen Präparationen miteinander verglichen werden. Der in der letzten Spalte der Tab. 2 berechnete Aktivitätsquotient F6PK/G1PK liegt im Mittel etwa bei 150.

TABELLE 2

Präparationen	G1PK-Akt. I.E./mg Pr.	F6PK-Akt. I.E./mg Pr.	F6PK/G1PK
H 396	0,42	63	150
H 727	0,31	47	152
N 316	0,61	91	150
N 411	0,59	87	148
N 494	0,69	102	148
N 495	0,79	119	151
Boe II	0,57	84	148
Boe III	0,44	65	148
H 1063+	1,54	232	150

+kristallisiertes Präparat (16)

Die damit berechtigte Vermutung, daß es sich bei der G1PK- und F6PK-Aktivität um ein und dasselbe Enzymprotein handelt, wird durch die folgenden Untersuchungen erhärtet.

Die Abb. 7 faßt das Ergebnis einer analytischen Chromatographie der hochgereinigten G1PK auf einer DEAE-Sephadex-Anionen-Austauschersäule zusammen. Die Verdrängung des Enzyms von der Säule erfolgt durch einen linearen Phosphatgradienten. In den chromatographisch gewonnenen Fraktionen wurden die Aktivitäten sowohl der G1PK als auch der F6PK gemessen. Wie die Abb. 7 zeigt, ist ihre Verteilung identisch und der Aktivitätsquotient F6PK/G1PK liegt in allen Fraktionen etwa bei 150/1.

Ebensowenig wie in der Ionen-Austausch-Chromatographie gelingt eine Trennung von G1PK und F6PK durch ein Verfahren, welches unterschiedliche Komponenten auf Grund unterschiedlicher Molekulargewichte zu charakterisieren und zu trennen vermag. Ein derartiges Verfahren ist die Sedimentation im linearen Saccharosegradienten nach HOGEBOOM (8), MARTIN und AMES (9). In Abb. 8 sind Resultate zweier Experimente zum Studium des Sedimentationsverhaltens im linearen Saccharosegradienten zwischen 5 und 20 % dargestellt. Das Diagramm zeigt die Sedimentation einer hochgereinigten Enzympräparation bei zwei verschiedenen pH-Werten (5,9 und 8,2) (10). In beiden Experimenten wurden nach Beendigung der Zentrifugation die Zentrifugenröhrchen an der Basis punktiert und 40 Fraktionen

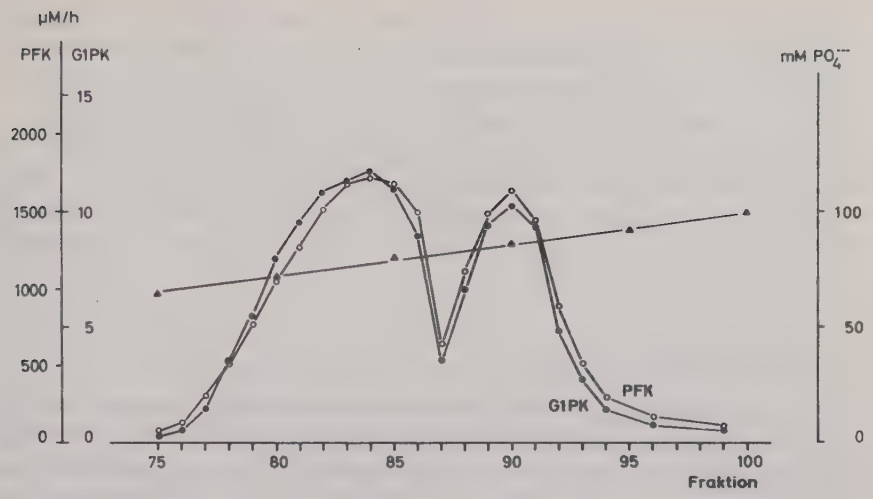


Abb. 7 Chromatographisches Verhalten von G1PK und F6PK auf der DEAE-Sephadex A 50 - Anionen-Austauscher-säule. Aufgetragen sind die in den jeweiligen Fraktionen bei steigender Phosphat-Konzentration erhaltenen Enzymaktivitäten.

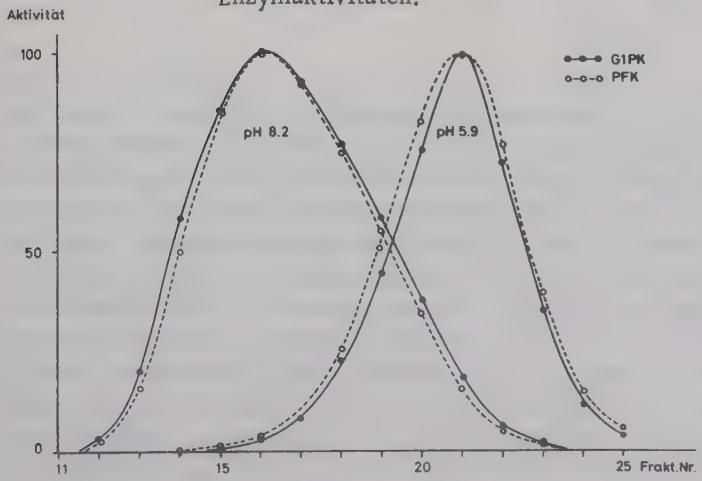


Abb. 8 Sedimentationsdiagramme von G1PK und F6PK im linearen Saccharosegradienten bei pH 8,2 und 5,9

gleicher Volumina (0,116 ml) entnommen. In diesen Fraktionen wurde die G1PK- und F6PK-Aktivität gemessen. Die in den einzelnen Fraktionen gemessenen Aktivitäten zeigt Abb. 8, wobei im Falle der G1PK und F6PK jeweils die Gipfelaktivität gleich 100 gesetzt wurde. Wie aus Abb. 8 hervorgeht, gelang eine Trennung von G1PK und F6PK auch mit diesem Verfahren nicht. Beide Enzymaktivitäten lassen eine übereinstimmende Abhängigkeit ihres Sedimentationsverhaltens vom pH-Wert (10) erkennen und zeigen unter den jeweiligen Bedingungen praktisch deckungsgleiche Sedimentationsdiagramme.

4.) Eigenschaften der G1PK:

Die im vorausgegangenen Abschnitt besprochenen Experimente machen deutlich, daß eine Trennung von G1PK- und F6PK-Aktivität mit den angewandten analytischen bzw. präparativen Methoden nicht möglich ist. Die Tatsache, daß Trennungsverfahren, die einerseits wie die Ionenaustausch-Chromatographie und andererseits wie die Sedimentation im Schwerefeld auf Unterschieden der Ladungseigenschaften bzw. des Molekulargewichts beruhen, eine Trennung der beiden Aktivitäten nicht gestatten, bestärkt aber die Annahme, daß es sich bei der G1PK um eine Nebenaktivität der F6PK handelt. Durch den Vergleich der Substrat-Affinität wird diese Annahme wesentlich gestützt.

a) Substrat-Affinität

Das gereinigte Enzymprotein reagiert mit F6P, F1P und G1P. Das Enzym setzt dagegen Glucose-6-Phosphat, Glucose und Fructose nicht meßbar um. Die Affinitäten zu F6P, F1P bzw. G1P variieren in erheblichem Maße. Unter identischen Bedingungen wurden für diese drei Hexose-Phosphate die jeweiligen Konzentrationen der Substratsättigung gemessen. Bei pH 7,6, 0,2 mM ATP und 6 mM $MgCl_2$ beträgt die Substratsättigung für F6P 2 mM, für F1P 10 mM und für G1P 70 mM. Die Michaeliskonstanten betragen unter diesen Bedingungen für F6P 3×10^{-5} Mol/Liter, für F1P $2,2 \times 10^{-3}$ Mol/Liter und für G1P $1,3 \times 10^{-2}$ Mol/Liter. Ganz entsprechend variieren auch die jeweils bei Substrat-Sättigung und konstanter Enzymmenge gemessenen Substratumsätze. Wird der in Gegenwart von 70 mM G1P gemessene maximale Substratumsatz gleich 1 gesetzt, so beträgt die Maximalgeschwindigkeit in Gegenwart von 10 mM F1P 8 und in Anwesenheit von 2 mM F6P 150.

TABELLE 3

	K_m (Mol/l)	Sättigungs-konzentration (Mol/l)	V_{max} (bez. auf G1P = 1)
G1P	$1,3 \times 10^{-2}$	7×10^{-2}	1
F1P	$2,2 \times 10^{-3}$	1×10^{-2}	8
F6P	$3,0 \times 10^{-5}$	2×10^{-3}	150

b) Magnesium-Abhängigkeit

Die für alle Kinasen charakteristische Abhängigkeit der Umsetzung vom Magnesium- bzw. Mangan-Ionen-Gehalt gilt auch im Falle der G1PK-Reaktion. Bei pH 7,6, 0,2 mM ATP und Substratsättigung mit G1P (70 mM) beträgt die optimale Mg^{++}-Konzentration 6 mM. Die genauere Analyse der Mg^{++}-abhängigen Reaktion ist in Abb. 9 dargestellt. In dem Diagramm sind die bei konstanter Enzymkonzentration und unter den oben genannten Bedingungen (pH 7,6, 0,2 mM ATP und 70 mM G1P) in Abhängigkeit zur Mg^{++}-Konzentration gemessenen Aktivitäten der G1PK aufgetragen. Die Messungen erfolgten in Abwesenheit von EDTA im zusammengesetzten optischen Test über die Bestimmung des gebildeten ADP im PK/LDH-System. Unter den gewählten Bedingungen wird bei 0,15 mM Mg^{++} halbmaximaler und bei 6 mM Mg^{++} maximaler Substratumsatz gemessen.

c) Nucleotid-Spezifität

Die Nucleotid-Spezifität der G1PK ist gering. Ebenso wie für die F6PK gilt, daß die Phosphorylierungsreaktion nicht ATP-spezifisch katalysiert wird. Das gereinigte Enzymprotein katalysiert die Phosphorylierung von G1P sowohl in Gegenwart von ATP als auch in Gegenwart von GTP, ITP, UTP und CTP. Nicht untersucht wurde, ob auch Thymidin-Triphosphat als Phosphatdonator fungieren kann. Obwohl G1PK in der Reaktion mit den verschiedenen Nucleosid-Triphosphaten relative Unspezifität aufweist, besteht gegenüber der Nucleosid-Triphosphat-Gruppe jedoch eine strenge Spezifität. Andere energiereiche Phosphate können das Nucleosid-Triphosphat bei der Phosphorylierungsreaktion nicht vertreten. Untersucht wurden Creatin-Phosphat und Phosphoenolpyruvat. In keinem Falle gelang der Nachweis einer Phosphorylierung von G1P in Gegenwart von Creatinphosphat bzw. Phosphoenolpyruvat.

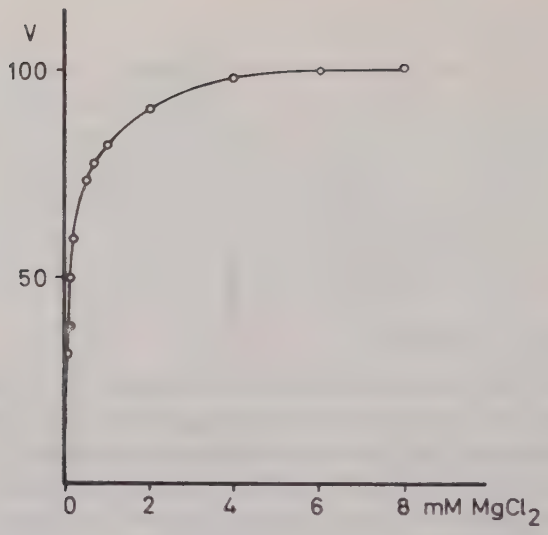


Abb. 9 Magnesium-Abhängigkeit der G1PK-Aktivität unter optimalen Testbedingungen (0,2 mM ATP, 50 mM G1P, pH 7,6)

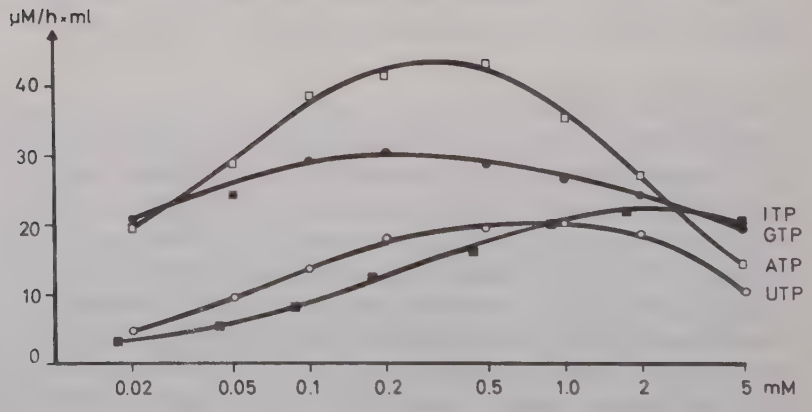


Abb. 10 Nucleotid-Abhängigkeit der G1PK bei pH 7,6. Aufgetragen sind die bei den jeweiligen Nucleosid-Triphosphat-Konzentrationen gemessenen Umsatzraten.

In Abb. 10 wird das Verhalten der G1PK gegenüber verschiedenen Nucleosid-Triphosphaten näher analysiert. In diesem Diagramm wurden die unter identischen Bedingungen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von ATP, GTP, ITP und UTP gemessenen Phosphorylierungsraten von G1P aufgetragen. Die Messungen erfolgten alle bei pH = 7,6, 20 mM G1P und 6 mM $MgCl_2$ im zusammengesetzten optischen Test über die Bestimmung des gebildeten Nucleosid-Diphosphats im PK/LDH-System. Die Menge der eingesetzten G1PK blieb konstant, variiert wurde allein die Konzentration des jeweiligen Nucleosid-Triphosphats. Beim Vergleich der einzelnen Kurven fällt auf, daß die verschiedenen Nucleosid-Triphosphate sich sowohl hinsichtlich der Sättigungskonzentration als auch hinsichtlich der bei den jeweiligen Sättigungskonzentrationen gemessenen Geschwindigkeiten unterscheiden. Einen bemerkenswerten Befund stellt außerdem die Hemmung der G1PK durch höhere Konzentrationen an Nucleosid-Triphosphat dar. Auch hierbei unterscheiden sich die einzelnen Komponenten durch das Ausmaß der Hemmung und durch die Konzentrationen, bei deren Überschreiten jeweils die Hemmung einsetzt. Unter den gewählten Bedingungen zeigt das Enzym offensichtlich die höchste Affinität zum ATP. Die Substratsättigung wird bei einer Konzentration von 0,3 mM ATP erreicht. Etwa die gleiche Konzentration gilt auch für die Substratsättigung des Enzyms mit GTP. In diesem Fall beträgt die Maximalgeschwindigkeit aber nur 70 % derjenigen, die in Gegenwart von ATP bei gleicher Konzentration erreicht wird. Ein weiterer Unterschied ist die wesentlich geringere Hemmung der G1PK durch GTP. In Gegenwart von UTP bzw. ITP wird die jeweilige Maximalgeschwindigkeit erst bei 1 mM bzw. bei 2 mM gemessen.
Die in Abb. 10 erkennbaren Unterschiede der Sättigungskonzentrationen und Maximalgeschwindigkeiten beruhen wohl zum Teil auf unterschiedlichen Größen der Substratbindungskonstanten des Enzyms für die einzelnen Nucleosid-Triphosphate. Allerdings lassen sich die für die verschiedenen Nucleosid-Triphosphate in Abb. 10 dargestellten Beziehungen zwischen der Konzentration und der Enzymaktivität nicht nur unter dem Gesichtspunkt unterschiedlicher Substrataffinitäten betrachten. Die beobachteten Phänomene der Enzymhemmung weisen darauf hin, daß bei der G1PK-Reaktion Nucleosid-Triphosphat nicht nur die Rolle eines Substrats, sondern auch die Bedeutung eines Effektors hat. Hinsichtlich der effektorischen Wirkung bestehen offensichtlich Unterschiede zwischen den einzelnen Nucleosid-Triphosphaten. Hier zeigt sich eine weitere Analogie des Verhaltens von G1PK und F6PK (12, 13, 14, 15, 16, 17).

Abb. 11 läßt die unterschiedliche Wirkung der einzelnen Nucleosid-Tri-

phosphate noch deutlicher hervortreten. Das Diagramm zeigt der Abb. 10 entsprechend die Abhängigkeit der G1PK-Aktivität von der Konzentration verschiedener Nucleosid-Triphosphate. Der einzige, aber wesentliche Unterschied gegenüber der Abb. 10 besteht darin, daß die in Abb. 11 aufgetragenen Meßwerte nicht bei pH = 7,6, sondern bei pH = 7,0 gemessen wurden. Im Falle von GTP und ITP läßt sich praktisch kein Einfluß des pH auf die Beziehung zwischen Enzymaktivität und Substratkonzentration nachweisen. Die bei pH 7,0 gemessenen Substratumsätze entsprechen den bei pH 7,6 bestimmten weitgehend. Die Ähnlichkeit betrifft sowohl die Sättigungskonzentrationen als auch die Maximalaktivitäten. Grundsätzliche Unterschiede bestehen jedoch im Falle von ATP und UTP. Das von 7,6 auf 7,0 verschobene pH verändert in ausgeprägter Weise den Kurvenverlauf. Weniger für UTP als für ATP gilt, daß die bei pH 7,0 gemessene Maximalgeschwindigkeit unter jener bei pH 7,6 liegt. Für ATP und UTP beträgt das Substratoptimum nur noch etwa ein Drittel der Konzentrationen, die bei pH 7,6 bestimmt wurden. In Zusammenhang mit der pH-abhängigen Verschiebung der Sättigungskonzentrationen steht auch die Verschiebung der Hemmkonzentrationen. Bei pH 7,6 (20 mM G1P, 6 mM $MgCl_2$) wird die G1PK durch 3 mM ATP zu 50 % gehemmt. Bei pH 7,0 (20 mM G1P, 6 mM $MgCl_2$) wird eine Hemmung gleichen Ausmaßes bereits durch 0,5 mM ATP bewirkt. Für UTP betragen die Konzentrationen zur 50 %igen Hemmung der G1PK bei pH 7,6 5,2 mM und bei pH 7,0 1,1 mM.

d) Hemmung der G1PK durch ATP in Abhängigkeit vom pH und der G1P-Konzentration

Das zuletzt besprochene Phänomen der pH-abhängigen Hemmung der G1PK durch Nucleosid-Triphosphate wird am Beispiel von ATP noch detaillierter untersucht. Insbesondere wird geprüft, welche Bedeutung in diesem Zusammenhang der Konzentration des G1P zukommt. In Abb. 12 ist die Hemmung der G1PK durch ATP bei pH 7,0 und pH 7,6 für zwei verschiedene G1P-Konzentrationen dargestellt. Die gemessenen Substratumsätze werden gegen die ATP-Konzentrationen aufgetragen. Die Maßstäbe von Abszisse und Ordinate sind logarithmisch. Bei Sättigung des Enzyms mit G1P (70 mM) und pH 7,6 wird maximaler Substratumsatz bei 0,5 mM ATP gemessen. Diese Geschwindigkeit wurde gleich 100 gesetzt. Eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität erfolgt unter diesen Bedingungen bei 5 mM ATP. Im Vergleich zur Abb. 11 zeigt sich hier ein Einfluß der G1P-Konzentration auf die Hemmbarkeit des Enzyms durch ATP. Noch klarer tritt dieser Einfluß zutage, wenn in Abb. 12 die mittlere Kurve betrachtet wird. Bei pH 7,6

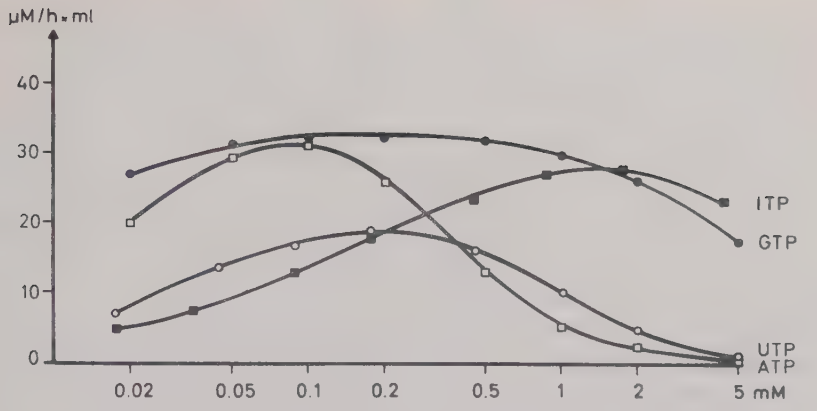


Abb. 11 Nucleotid-Abhängigkeit der G1PK bei pH 7,0. Die Messungen erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 10 (Näheres siehe Text).

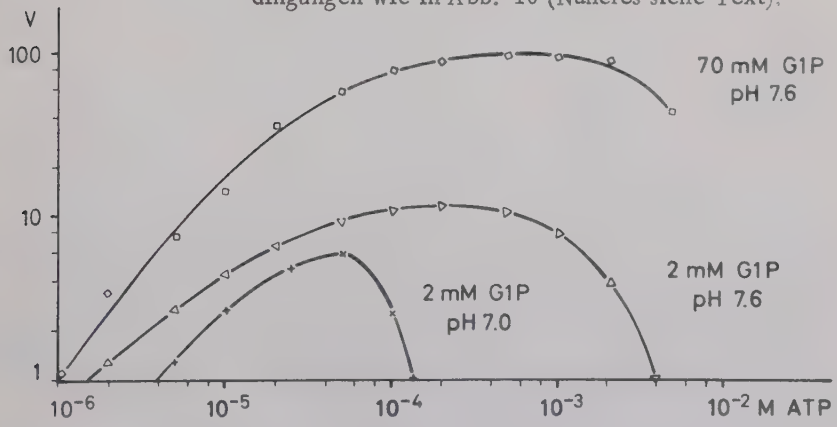


Abb. 12 Hemmung der G1PK durch ATP in Abhängigkeit vom pH und der G1P-Konzentration. Die Maximalaktivität wurde in der Ordinate = 100 gesetzt. Die Aktivität und die ATP-Konzentration sind jeweils in logarithmischem Maßstab aufgetragen.

und 2 mM G1P, einer Konzentration, die weit unterhalb der Substratsättigung liegt und damit auch zu einem geringeren Substratumsatz führt, wird eine 50 %ige Hemmung des Enzyms bereits bei einer ATP-Konzentration von 1,5 mM erreicht. Über die G1P-Abhängigkeit hinaus hat das pH, wie schon in Abb. 10 und Abb. 11 demonstriert wurde, einen maßgeblichen Einfluß auf die Enzymaktivität und ATP-Hemmung. Der Vergleich der mittleren und unteren Kurve in Abb. 12 zeigt diesen Einfluß des pH besonders deutlich. Bei einem pH von 7,0 und 2 mM G1P erfolgt die 50 %ige Hemmung bereits bei 0,1 mM ATP. Die maximale Aktivität wird unter diesen Bedingungen bei einer Konzentration von 0,05 mM ATP erreicht.
Die in Abb. 12 gezeigten Verhältnisse werden ergänzt durch die in Abb. 13 wiedergegebenen Befunde. Bei dieser Versuchsserie stand der Einfluß der G1P-Konzentration auf die pH- und ATP-abhängige Hemmung der G1PK im Vordergrund. In dieser Abbildung wurde die bei pH 7,6 und und 0,2 mM ATP gemessene Maximalaktivität gleich 100 gesetzt (Kurve 1). Die unter diesen Bedingungen in Abhängigkeit zur G1P-Konzentration gemessenen Geschwindigkeiten geben in der obersten Kurve die für optimale Testbedingungen geltende Substratsättigungskurve des Enzyms wieder (Vergl. Kap. 4 a). Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Kurve 2, die bei pH 7,6 und 2 mM ATP gemessen wurde. In Gegenwart von 2 mM ATP wird auch bei pH 7,6 eine geringgradige Hemmung des Enzyms deutlich. Ausgeprägtere Unterschiede finden sich, wenn die Substratsättigung des Enzyms bei pH 7,0 gemessen wird. Kurve 3 zeigt die Substratsättigung in Gegenwart von 0,2 mM ATP. Kurve 4 zeigt diejenige bei 2 mM ATP. Im Gegensatz zu den Kurven 1 und 2, die annähernd hyperbolischen Charakter haben, zeigen die Kurven 3 und 4 einen sigmoiden Verlauf. Sehr deutlich tritt der bereits anhand der Abb. 10, 11 und 12 besprochene Effekt der verstärkten ATP-Hemmung bei pH 7,0 zutage (Kurve 4). Darüber hinaus wird aber klar, welchen Einfluß die G1P-Konzentration auf das Ausmaß dieser Hemmung hat. Die bei niedrigen G1P-Konzentrationen 100 %ige Hemmung des Enzyms durch 2 mM ATP und pH 7,0 wird durch steigende G1P-Konzentrationen jedenfalls partiell wieder aufgehoben. Damit besteht eine ähnliche Beziehung zwischen der Substrat-Konzentration und der ATP-Hemmung wie im Falle der F6PK (12, 13, 14, 15, 18).

Die pH-abhängige Hemmung der G1PK durch ATP und ihre partielle Aufhebung durch Erhöhung der G1P-Konzentration wird in Abb. 14 nochmals dargestellt. In dieser Darstellung wurde die bei verschiedenen ATP- und G1P-Konzentrationen gemessene Geschwindigkeit direkt auf die Wasserstoffionen-Konzentration, die auf der Abszisse als pH aufgetragen wurde, bezogen. Die Ordinate gibt wiederum relative Geschwindigkeiten an. Die unter den jeweiligen Bedingungen gemessenen Maximalaktivitäten wurden = 100 gesetzt. Mit dieser

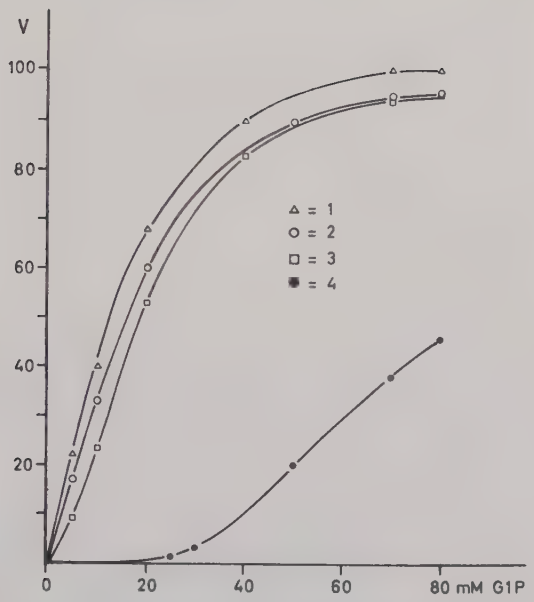


Abb. 13 G1P-Sättigung der G1PK in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration und dem pH. Die Maximalaktivität wurde bei 0,2 mM ATP und pH 7,6 gleich 100 gesetzt (Kurve 1).
Kurve 2 wurde bei 2 mM ATP und pH 7,6, Kurve 3 wurde bei 0,2 mM ATP und pH 7,0, Kurve 4 wurde bei 2 mM ATP und pH 7,0 gemessen.

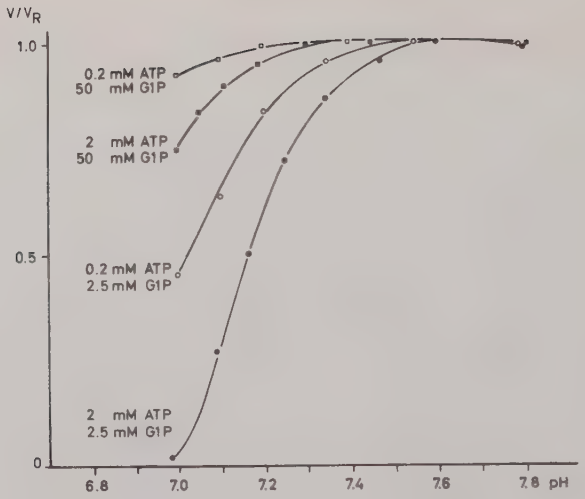


Abb. 14 pH-Abhängigkeit der G1PK bei verschiedenen ATP- und G1P-Konzentrationen. Die bei den jeweiligen ATP- und G1P-Konzentrationen bestimmten Maximalaktivitäten wurden gleich 1 gesetzt.

Art der Darstellung wird der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die ATP-Hemmung des Enzyms noch klarer als in den vorausgegangenen Abbildungen zum Ausdruck gebracht. Bei niedriger ATP-Konzentration und angenäherter Substratsättigung des Enzyms (0,2 mM ATP, 50 mM G1P) zeigt das pH wenig Einfluß auf die Enzymaktivität. Die entsprechende Kurve gibt praktisch die unter optimalen Bedingungen gemessene pH-Abhängigkeit des Enzyms wieder. Erhöhung der ATP-Konzentration auf 2 mM zeigt für den physiologisch interessanten Bereich zwischen pH 7,0 und pH 7,4 bereits einen deutlichen Effekt. Besonders eindrucksvoll ist der pH-Effekt aber bei niedrigen G1P-Konzentrationen. In Gegenwart von 0,2 mM ATP bewirkt ein Anstieg des pH von 7,0 auf 7,4 praktisch eine Verdoppelung der Enzymaktivität. In Gegenwart von 2 mM ATP wird durch entsprechenden Anstieg des pH eine Aktivitätssteigerung des Enzyms um den Faktor 30 erzielt.

e) Kinetische Modulation der G1PK durch Effektoren

Die im voranstehenden Kapitel geschilderten Befunde stellen klar, daß für die G1PK-Reaktion ATP nicht nur Bedeutung als Substrat, sondern auch als Effektor hat. Ebenfalls wurde am Beispiel der pH-Effekte deutlich, daß auch Protonen eine effektorische Wirkung auf das Enzym ausüben. Das Enzym wird sowohl durch hohe Konzentrationen an ATP als auch durch im physiologischen Sinne hohe Wasserstoffionen-Konzentrationen gehemmt. In Anbetracht sehr ähnlicher Einflüsse beider Faktoren auf die F6PK lag es nahe, auch andere für dieses Enzym bekannten Effektoren (17, 18, 19, 20, 22, 23) hinsichtlich ihrer Bedeutung für die G1PK zu prüfen. Untersucht wurden folgende Substanzen: 5'-AMP, cyclisches 3',5'-AMP, IMP, Ammonsulfat, Glucose-1,6-Diphosphat, anorganisches Phosphat, Creatin, Creatinphosphat und Citrat. Bereits in geringen Konzentrationen haben vor allem 5'-AMP (1 mM) und 3',5'-AMP (0,2 mM) eine außerordentlich stark aktivierende Wirkung auf die G1PK. Positive Effektoren der G1PK sind auch IMP (2 mM), Ammonsulfat (10 mM), G16P (0,2 mM) und anorganisches Phosphat (10 mM). In gleicher Reihenfolge nimmt die Wirksamkeit dieser Effektoren ab. Praktisch keinen Effekt auf die Enzymaktivität hat das Creatin (10 mM). Im Gegensatz dazu sind Creatinphosphat (5 mM) und in stärkerem Maß noch Citrat (0,2 mM) ausgesprochene Inhibitoren der G1PK.

In Abb. 15 werden die Wirkungen einiger der aufgezählten Effektoren demonstriert. In der Darstellung sind die bei konstanter Enzymmenge, 2 mM ATP und bei pH 7,0 gemessenen Substratumsätze gegen die G1P-Konzentration aufgetragen. Wie bereits besprochen, wirkt ATP in der eingesetzten Konzentration bei pH 7,0 stark hemmend. Diese Hemmung wird durch Steigerung der G1P-Konzentration partiell aufgehoben. In der Abb. 15 ist die unter diesen Bedingungen gemessene Maximalaktivität = 100 gesetzt (Kontrollkurve). Unter identischen Bedingungen, aber in Gegenwart von 0,2 mM Citrat, zeigt sich eine ausgeprägte Hemmung des Enzyms, die über diejenige durch ATP allein (Kontrollkurve) hinausgeht und auch nur in geringerem Maße durch Erhöhung der G1P-Konzentration aufgehoben wird. 5'-AMP, 3',5'-AMP und Ammonsulfat wirken im Gegensatz dazu als Aktivatoren. In Gegenwart dieser Effektoren wird die = 100 gesetzte Kontrollgeschwindigkeit nicht nur bei niedrigeren G1P-Konzentrationen erreicht, sondern auch erheblich überschritten. Den stärksten Effekt zeigt hierbei 5'-AMP.

Die Wirkung von 5'-AMP im Sinne eines potenten Aktivators der G1PK folgt besonders aus den in Abb. 16 wiedergegebenen Befunden. In dieser Versuchs-

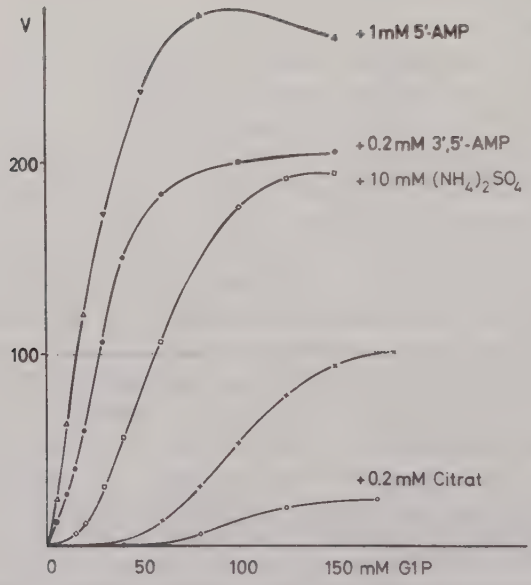


Abb. 15 Kinetische Modulation der G1PK durch verschiedene Effektoren. Die Enzymaktivität in Ab- oder Anwesenheit verschiedener Effektoren wurde gegen die G1P-Konzentration aufgetragen. Die Maximalaktivität in Abwesenheit von Effektoren wurde = 100 gesetzt.
Testbedingungen: 2 mM ATP, pH 7,0, 6 mM $MgCl_2$.

serie wurde der Einfluß von 5'-AMP, 3',5'-AMP, Creatinphosphat und Citrat unter Bedingungen untersucht, bei denen die G1PK weder durch ATP noch durch Wasserstoffionen gehemmt ist. Der von G1PK katalysierte Substratumsatz wurde bei 0,05 mM ATP, 30 mM G1P und pH = 7,6 gemessen.

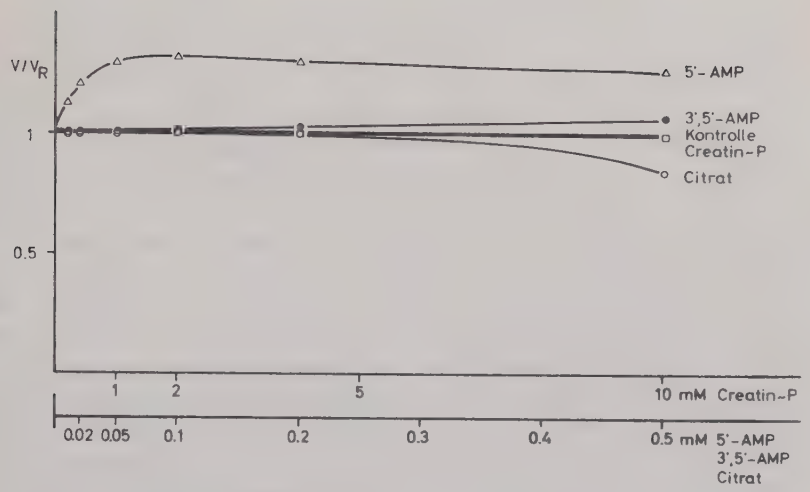


Abb. 16 Einfluß verschiedener Effektoren auf die G1PK-Aktivität in Abhängigkeit zu ihrer Konzentration. Testbedingungen: 0,05 mM ATP, pH 7,6, 30 mM G1P, 6 mM $MgCl_2$.
V_R stellt die unter diesen Bedingungen gemessene Geschwindigkeit ohne Zusatz von Effektoren dar.

In getrennten Versuchsansätzen wurde die Einwirkung der verschiedenen Effektoren in Abhängigkeit zu ihrer Konzentration untersucht. Die Konzentrationen der Effektoren sind in der Abszisse und die gemessenen Substratumsätze in der Ordinate aufgetragen. Dabei wurden die Geschwindigkeiten nicht absolut aufgetragen, sondern jeweils auf die ohne Effektorzusatz gemessene Umsatzrate bezogen. Diese Kontrollgeschwindigkeit wurde gleich 1 gesetzt.

Mit dieser Auftragung wird deutlich, daß die Einwirkung von Effektoren auf die G1PK in erheblichem Maße von der ATP- und Wasserstoffionen-Konzentration abhängt. Bei pH 7,6 und 0,05 mM ATP wirkt Creatinphosphat überhaupt nicht hemmend. Weder 3',5'-AMP noch Citrat zeigen einen

wesentlichen effektorischen Einfluß. Nur das 5'-AMP weist unter diesen Bedingungen einen schwach aktivierenden Einfluß auf. Die Abhängigkeit der Effektorwirkung von ATP- und Wasserstoffionen-Konzentration wird in der Abb. 17 weiter belegt. Mit der einzigen Ausnahme, daß die ATP-Konzentration auf 1 mM erhöht wurde, entsprechen die übrigen Bedingungen denjenigen, die der in Abb. 16 wiedergegebenen Versuchsserie zugrunde liegen. Die Konzentration von 1 mM ATP hat bei pH 7,6 einen hemmenden Effekt. Tatsächlich kann hier nun auch eine zusätzliche Hemmung durch Creatinphosphat und Citrat erzielt werden. In beiden Fällen nimmt die Hemmung mit steigender Konzentration der Effektoren zu. Dabei bewirkt Creatinphosphat in einer Konzentration von 10 mM den gleichen Effekt, wie 0,5 mM Citrat. Aus dem Vergleich von Abb. 16 und Abb. 17 wird klar, daß Creatinphosphat und Citrat eine inhibierende Wirkung nur am ATP-gehemmten Enzym entfalten. Beide Effektoren potenzieren damit die ATP-Hemmung. In gleicher Weise zeigt sich nun, daß auch 3',5'-AMP einen aktivierenden Effekt nur am ATP-gehemmten Enzym aufweist. Im Vergleich zu Abb. 16 ist die Wirkung des 5'-AMP auf das ATP-gehemmte Enzym stärker. 3',5'-AMP und 5'-AMP wirken als Deinhibitoren des ATP-gehemmten Enzyms. Wie aus Abb. 16 folgt, hat das 5'-AMP zusätzlich aber noch einen echten aktivierenden Einfluß auf die G1PK.

Die potenzierende Hemmung von Creatinphosphat und Citrat bzw. der deinhibierende Effekt von 3',5'-AMP und 5'-AMP tritt noch deutlicher zutage, wenn die Einflüsse nicht nur am ATP-, sondern am zugleich auch durch Wasserstoffionen gehemmten Enzym untersucht werden. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 18 dargestellt. Die Messungen wurden bei 1 mM ATP nunmehr bei pH 7,0 unter den obengenannten Versuchsbedingungen durchgeführt. Bei 30 mM G1P, 1 mM ATP und pH 7,0 ist der gemessene Umsatz minimal (vergl. Abb. 13 und Abb. 15). Dieser Umsatz wurde wiederum als Referenzgeschwindigkeit herangezogen und = 1 gesetzt. Die von vornherein durch ATP und Wasserstoffionen-Konzentration bewirkte Hemmung des Enzyms erklärt den maximal hemmenden Effekt von Citrat und Creatinphosphat schon bei geringen Konzentrationen. In gleicher Weise läßt sich auch der ausgeprägte aktivierende Effekt vor allem des 3',5'-AMP und bei höheren Konzentrationen auch des 5'-AMP deuten. Beide Effektoren vermögen die durch pH und ATP verursachte Hemmung des Enzyms aufzuheben. Die Wirkung von 3',5'-AMP ist bereits bei einer Konzentration von 0,1 mM optimal, während eine gleiche Aktivierung durch 5'-AMP erst bei einer Konzentration von 0,37 mM zu verzeichnen ist. In Bezug auf die zur halbmaximalen Reaktivierung des Enzyms nötige Konzentration unterscheiden sich beide Komponenten

um mehr als eine Größenordnung.

Ein Vergleich der in Abb. 17 und Abb. 18 dokumentierten Experimente zeigt die vom Hemmungsgrad des Enzyms abhängige Wirksamkeit positiver und negativer Effektoren. Er stellt Beziehungen zwischen dem Ausmaß der vorgegebenen Hemmung und den für Potenzierung bzw. Aufhebung der Hemmung erforderlichen Effektor-Konzentrationen her. Besonders interessant sind die Verhältnisse im Falle des 5'-AMP und 3',5'-AMP. Hier zeigt sich nämlich, daß die für eine Reaktivierung des Enzyms erforderliche 5'-AMP-Konzentration mit zunehmender Hemmung des Enzyms ansteigt. Im Gegensatz dazu ist aber die für eine Reaktivierung der G1PK erforderliche Konzentration an 3',5'-AMP offensichtlich weniger abhängig von der vorgegebenen Hemmung. Die zuletzt getroffene Feststellung wird durch die in den Abb. 19 und 20 gezeigten Experimente erhärtet. Die hier demonstrierten Untersuchungen betreffen die Wechselwirkung antagonistisch wirkender Effektoren der G1PK. Untersucht wurde, inwieweit die durch Citrat bzw. Creatinphosphat potenzierte ATP-Hemmung der G1PK durch 5'-AMP bzw. 3',5'-AMP aufgehoben werden kann. Abb. 19 zeigt diese Verhältnisse im Falle von Citrat und Abb. 20 die im Falle von Creatinphosphat.

Die den Abb. 19 und 20 zugrundeliegenden Versuche wurden bei einer G1P-Konzentration von 70 mM, einer ATP-Konzentration von 2 mM und bei pH 7,0 durchgeführt. Die unter diesen Bedingungen und ohne weiteren Zusatz von Effektoren gemessene Geschwindigkeit wurde = 1 gesetzt. Die durch Punkte wiedergegebenen Kurven dokumentieren in beiden Abbildungen die Aktivierung des Enzyms durch 5'-AMP bzw. 3',5'-AMP in Abhängigkeit zu ihrer Konzentration.

Abb. 19 zeigt die Hemmung des Enzyms durch 0,1 mM Citrat und die Aufhebung dieser Hemmung in Gegenwart steigender Konzentrationen von 5'-AMP bzw. 3',5'-AMP. Das Experiment beinhaltet zweierlei: 5'-AMP und 3',5'-AMP vermögen einerseits die durch Citrat potenzierte ATP-Hemmung des Enzyms vollständig aufzuheben und wirken andererseits auch partiell antagonistisch zur ATP- und pH-bedingten Hemmung der G1PK. Auch in Bezug auf die zusätzliche Hemmung der G1PK durch Citrat erweist sich das 3',5'-AMP im Vergleich zum 5'-AMP als der potentere Deinhibitor. Besonders bei niedriger Effektor-Konzentration tritt die stärkere Wirkung des 3',5'-AMP hervor. So wird die durch 0,1 mM Citrat verursachte 90 %ige Hemmung des Enzyms bereits durch 0,005 mM 3',5'-AMP vollständig aufgehoben, während 5'-AMP den gleichen Effekt erst bei einer Konzentration von 0,03 mM erzielt.

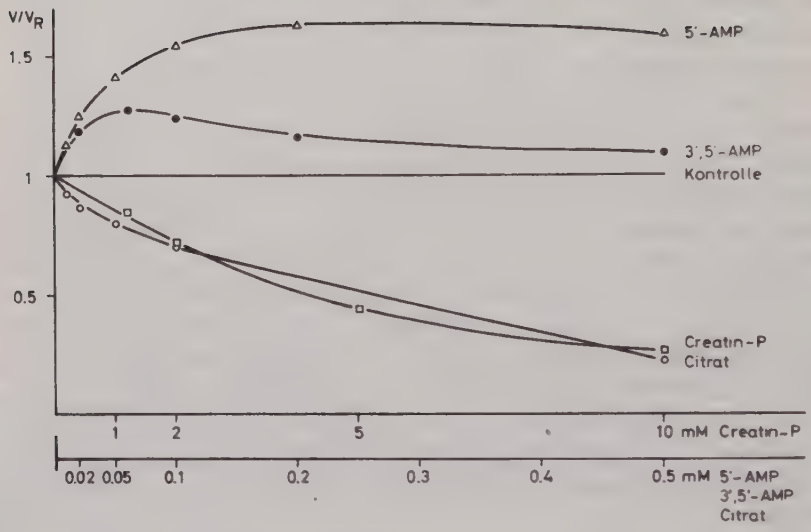


Abb. 17 Einfluß verschiedener Effektoren auf die G1PK-Aktivität in Abhängigkeit zu ihrer Konzentration. Testbedingungen: 1 mM ATP, pH 7,6, 30 mM G1P, 6 mM $MgCl_2$.

V_R stellt die unter diesen Bedingungen gemessene Geschwindigkeit ohne Zusatz von Effektoren dar.

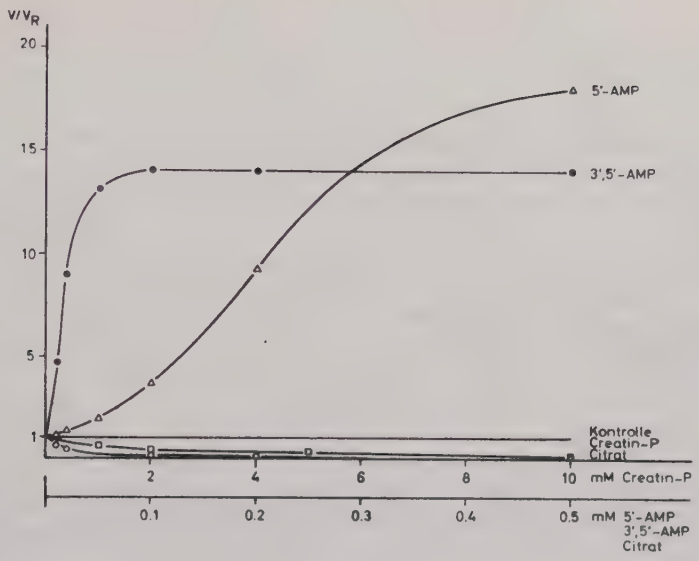


Abb. 18 Einfluß verschiedener Effektoren auf die G1PK-Aktivität in Abhängigkeit zu ihrer Konzentration. Testbedingungen: 1 mM ATP, pH 7,0, 30 mM G1P, 6 mM $MgCl_2$.

V_R stellt die unter diesen Bedingungen gemessene Geschwindigkeit ohne Zusatz von Effektoren dar.

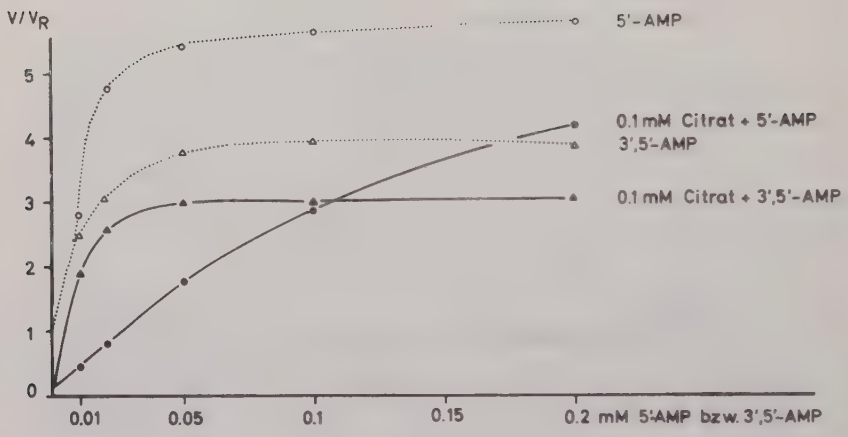


Abb. 19 Hemmung der G1PK durch Citrat und Aufhebung dieser Hemmung durch 5'-AMP bzw. 3',5'-AMP in steigenden Konzentrationen.
Testbedingungen: 2 mM ATP, pH 7,0, 70 mM G1P, 6 mM $MgCl_2$. Die ohne Zusatz von Effektoren gemessene Geschwindigkeit wurde gleich 1 gesetzt.

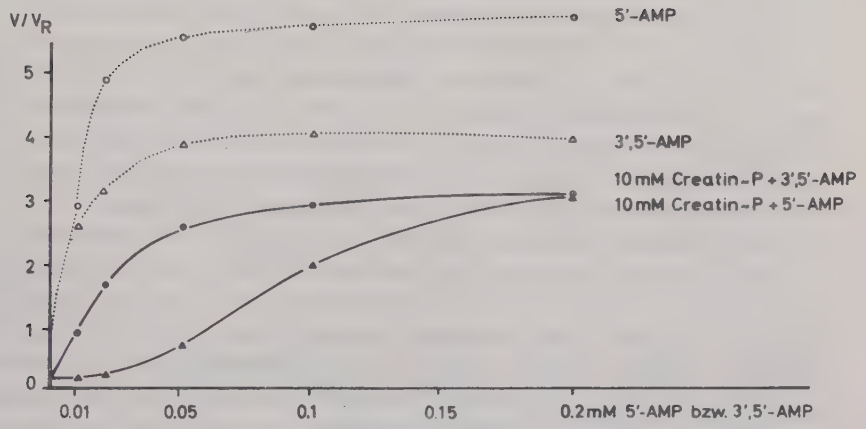


Abb. 20 Hemmung der G1PK durch Creatinphosphat und Aufhebung dieser Hemmung durch 5'-AMP bzw. 3', 5'-AMP in steigenden Konzentrationen. Testbedingungen und Referenzgeschwindigkeit siehe Legende zu Abb. 19.

Abb. 20 gibt in analoger Weise die Verhältnisse bei der Hemmung der G1PK durch Creatinphosphat wieder. Bei 2 mM ATP und pH 7,0 wird das Enzym durch 10 mM Creatinphosphat zu etwa 90 % gehemmt. Durch 0,01 mM 3', 5'-AMP und entsprechend erst durch 0,06 mM 5'-AMP wird diese Hemmung vollständig aufgehoben. Höhere Konzentrationen beider Effektoren bewirken darüber hinaus auch eine partielle Aufhebung der durch ATP und pH verursachten Hemmung des Enzyms. Das 3', 5'-AMP erweist sich bei geringen Konzentrationen auch hier als der wirksamere Deinhibitor.

DISKUSSION

Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Untersuchungen betreffen zwei Fragestellungen:
1. Die Identität der Glucose-1-Phosphat-Kinase und
2. die Regulierbarkeit der G1PK bzw. ihre regulierende Funktion.
Zellphysiologisch bedeutsam erscheint vor allem die Beantwortung der zweiten Frage. Die regulatorische Einwirkung der G1PK auf die PGM folgt aus der Besonderheit der katalysierten Reaktion. Das Reaktionsprodukt ist nicht wie im Falle der übrigen Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels Zwischenstufe einer anabolen oder katabolen Stoffwechselkette, sondern Regulator der Phosphoglucomutase. Der von NAJJAR und PULLMAN klargestellte Mechanismus der Phosphoglucomutase-Reaktion (3) weist dem G16P eine Schlüsselfunktion für die Überführung der inaktiven Dephosphoform in die aktive Phosphoform der PGM zu. Die Stöchiometrie der G16P-abhängigen Phosphorylierung der PGM macht verständlich, daß die für diesen Vorgang erforderliche Menge an G16P außerordentlich gering ist. Die Konzentration der Phosphoglucomutase im Muskel läßt sich auf Grund des Aktivitätsgehaltes, der spezifischen Aktivität des kristallisierten Enzyms und des Molekulargewichtes berechnen. Nach eigenen Messungen und den der Literatur entnommenen Daten liegt die Konzentration der Phosphoglucomutase im Skelettmuskel des Kaninchens bei etwa 5×10^{-9} Mol/g Muskel. Im gleichen Konzentrationsbereich findet sich im Muskel auch das G16P, das mit Hilfe des standardisierten Beschleunigungstests der PGM (vergl. Methodik) bestimmt werden kann. Darüber hinaus ergeben die Messungen deutliche Bewegungen des G16P-Spiegels in Abhängigkeit zum Funktionsstatus des Muskels. Im ruhenden Muskel ist der G16P-Spiegel niedrig und steigt im tetanisch gereizten Muskel an. Der niedrigste Ruhewert wurde mit 3 nMol/g Muskel und der höchste Wert im tetanisch gereizten Muskel wurde mit 35 nMol/g Muskel bestimmt. Die vorliegenden Meßergebnisse reichen nicht aus, um eine statistisch gesicherte quantitative Zuordnung zu treffen. Immerhin folgt aus den gemessenen Bewegungen des G16P-Spiegels, daß dem Übergang des Muskels vom ruhenden in den aktiven Status ein Anstieg des G16P parallel geht. Es liegt nahe, den Anstieg des G16P-Spiegels der Wirkung eines G16P-produzierenden Systems zuzuordnen.

Bereits 1949 wurde von PALADINI et al. (6) ein Enzym aus Kaninchenmuskel isoliert und beschrieben, welches in ATP-abhängiger Reaktion G1P zu G16P phosphoryliert. Im Hinblick auf die ebenfalls seit Jahren bekannte

G16P-abhängige Stimulierung der Phosphoglucomutase ist es erstaunlich, daß dieses System bei den Untersuchungen zur Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels bisher praktisch völlig außer Acht gelassen wurde. Mit dem in Abb. 3 gezeigten Experiment wird die Bedeutung einer G16P-abhängigen Regulation der PGM klar demonstriert. Aus dem Ergebnis dieses Experiments folgt, daß die PGM im ruhenden Muskel mit mehr als 98 % in der inaktiven Dephosphoform vorliegt und erst in Anwesenheit von G16P in die aktive Form überführt wird. Die Verfolgung des zellulären G16P-Spiegels im ruhenden und tetanisch gereizten Muskel liefert eindeutige Hinweise für eine entsprechende Aktivierung der PGM auch in vivo. Daß eine Regulierung des G16P-Spiegels im Muskel prinzipiell möglich ist, folgt auf der Ebene enzymologischer Befunde aus dem Nachweis sowohl G16P-produzierender als auch G16P-spaltender Enzyme (5). Die Wirkung der G1PK als eines G16P produzierenden Enzyms auf die PGM ist in Abb. 4 ersichtlich. Das Experiment zeigt die Stimulierung der PGM in Abhängigkeit zu dem in der G1PK-Reaktion gebildeten G16P. Damit ist zunächst allein die Bedeutung der G1PK für die Bereitstellung von G16P bewiesen. Eine wirksame Steuerung der PGM auf diesem Wege setzt allerdings eine Regulation des G16P-Spiegels voraus. Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Untersuchungen beschäftigen sich mit der Regulation des G16P-bildenden Systems.

Aus Kaninchenmuskel wurde die von PALADINI et al. beschriebene Glucose-1-Phosphat-Kinase hochgradig gereinigt. PALADINI und Mitarb. gelang eine Reinigung des Enzyms aus Kaninchenmuskel um das 4-fache. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Präparationsmethode wurde eine Reinigung des Enzyms um das 150-fache erzielt. Die erzielte Reinheit erwies sich als maximal und konnte nicht weiter gesteigert werden. Die hohe Reinheit des Enzyms wie auch die Ausarbeitung sehr empfindlicher und spezifischer Aktivitätstests bildeten die Voraussetzung für ein detailliertes Studium der kinetischen Eigenschaften der G1PK.

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung kann die G1PK in die Gruppe der sogen. "allosterisch regulierten" Enzyme eingereiht werden. Verschiedenste Effektoren haben modifizierende Wirkung auf die Eigenschaften der G1PK und vermögen die katalytische Aktivität des Enzyms auf der Grundlage einer "kinetischen Modulation" (12, 13, 14, 15) zu beeinflussen. Damit zeichnen sich Möglichkeiten für eine wirksame Steuerung der G16P-Bildung durch Regulation der G1PK ab. Je nach Art des Effektors werden sowohl aktivierende als auch hemmende Einflüsse auf die Enzymaktivität beobachtet. Stärkster Inhibitor der G1PK ist das ATP. Gleichfalls negative

Effektoren sind Protonen, Citrat und Creatinphosphat. Im Gegensatz zum ATP wirken diese Inhibitoren aber offensichtlich sekundär. Ihre hemmende Wirkung zeigt sich nämlich erst in Gegenwart von ATP, d.h. an dem bereits durch ATP vorgehemmten Enzym. Damit läßt sich die Wirkung von Protonen, Citrat und Creatinphosphat im Sinne einer Potenzierung der ATP-Hemmung beschreiben. Zellphysiologisch ist dieser Befund besonders aufschlußreich, weil die Steuerung der Enzymaktivität durch den ATP-Spiegel in einem physiologischen Bereich pH-abhängig ist. Die Hemmkonzentration des ATP sinkt mit fallendem pH und nimmt mit steigendem pH zu. In entsprechender Weise lassen sich die Wirkungen von Citrat und Creatinphosphat mit der ATP-Hemmung korrelieren: Die Hemmkonzentration des ATP sinkt mit steigendem Spiegel des Citrats bzw. Creatinphosphats und umgekehrt. Die ATP-Hemmung selbst läßt sich, wenn auch stark vereinfachend, durch eine Erhöhung der scheinbaren Michaeliskonstante des Enzyms für das Substrat G1P deuten. Tatsächlich wird ja die ATP-Hemmung durch Erhöhung der G1P-Konzentration zumindest teilweise wieder aufgehoben (vergl. Abb. 12 - 14). Freilich sind die für eine Aufhebung der ATP-Hemmung erforderlichen G1P-Konzentrationen so hoch, daß ihnen keinerlei physiologische Bedeutung zukommen kann.

Die Regulation der G1PK gründet sich nicht allein auf die kinetische Modulation durch negative Effektoren. Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang einer Reihe von positiven Effektoren zu. Nach den vorliegenden Untersuchungen sind 5'-AMP, 3',5'-AMP, IMP, Ammonsulfat, G16P und anorganisches Phosphat positive Effektoren der G1PK. Die genauere Analyse legt klar, daß diese Effektoren einen aktivierenden Einfluß nur an dem ATP-gehemmten Enzym entfalten. Die Wirkung der obengenannten Effektoren erklärt sich in einer Aufhebung der ATP-bedingten Hemmung des Enzyms. Eine gewisse Ausnahme macht hierbei das 5'-AMP. Im Gegensatz zu den übrigen positiven Effektoren führt 5'-AMP nicht nur eine Aufhebung der ATP-Hemmung, sondern zusätzlich eine echte Aktivierung der nicht gehemmten G1PK herbei. Die deinhibierende Eigenschaft der positiven Effektoren läßt sich umgekehrt wie im Falle der ATP-Hemmung auf eine Erniedrigung der scheinbaren Michaeliskonstante der G1PK für G1P zurückführen. Die durch hohe Konzentration von ATP erhöhte scheinbare Michaeliskonstante für G1P wird in Gegenwart positiver Effektoren herabgesetzt. Dabei ist die Wirksamkeit der einzelnen positiven Effektoren wie z.B. Abb. 15 illustriert, verschieden. Am ATP-gehemmten Enzym ist ohne Zweifel das 5'-AMP der stärkste Aktivator der G1PK. Im Vergleich zu 5'-AMP ist das zyklische 3',5'-AMP ein zwar schwächerer positiver Effektor, wirkt aber

schon bei wesentlich geringeren Konzentrationen. Zellphysiologisch erscheint diese Feststellung bedeutsam. Bei extremer Hemmung der G1PK, wie im Falle der pH-potenzierten ATP-Hemmung, tritt die hohe Wirksamkeit des 3',5'-AMP als Deinhibitor bereits in geringer Konzentration klar zutage (vergl. Abb. 18). Die im Vergleich zum 5'-AMP durch wesentlich geringere 3',5'-AMP-Konzentrationen verursachten Effekte werden noch deutlicher, wenn der Einfluß beider Effektoren unter den der Abb. 19 und 20 zugrundegelegten Bedingungen geprüft wird. Die bei pH 7,0 durch Citrat bzw. Creatinphosphat potenzierte ATP-Hemmung der G1PK wird sowohl durch 5'-AMP als auch durch 3',5'-AMP partiell aufgehoben. Dabei entfaltet das 3',5'-AMP seine deinhibierende Wirkung in einem wesentlich niedrigeren Konzentrationsbereich als das 5'-AMP.

Die synoptische Betrachtung dieser Befunde in Bezug auf die Regulation der G1PK-Aktivität ergibt folgendes Bild:
Bei physiologischem pH wird die G1PK durch ATP in physiologischer Konzentration stark gehemmt. Citrat und Creatinphosphat potenzieren den hemmenden Einfluß von ATP. 3',5'-AMP und 5'-AMP sowie weitere positive Effektoren, denen zellphysiologisch geringere Bedeutung beizumessen ist, vermögen die ATP-bedingte und auch die durch Citrat bzw. Creatinphosphat potenzierte Hemmung des Enzyms aufzuheben. Aus der Wechselwirkung inhibierender und deinhibierender Nucleotide und Metabolite auf die G1PK ergeben sich Möglichkeiten für eine wirksame Regulation des G16P-Spiegels in der Zelle. Über die Rolle des G16P als Aktivator der Phosphoglucomutase erstreckt sich die Wirkung dieses Regelsystems letztlich auf die Aktivität der Phosphoglucomutase. In der Muskelzelle besteht damit die Möglichkeit, die Einschleusung von Glykogen in den Embden-Meyerhof-Abbau auf der Stufe des G1P zu steuern. Insofern tritt die G16P-abhängige Regulation der Phosphoglucomutase als zusätzliches Regelsystem der Glykogenolyse neben den an der Phosphorylase angreifenden Steuermechanismus. Bemerkenswert ist, daß das 3',5'-AMP eine Schlüsselrolle sowohl bei der Aktivierung der Phosphorylase als auch bei der Aktivierung des G1PK/PGM-Systems spielt. Unter zellphysiologischem Aspekt zeichnet sich überhaupt eine auffällige Abstimmung im Zusammenspiel dieser beiden Regelsysteme ab. In Bezug auf die Glykogenolyse aktiviert das 3',5'-AMP bekanntlich die Phosphorylase-b-Kinase und bewirkt damit indirekt die Überführung der Phosphorylase b in die Phosphorylase a. 3',5'-AMP aktiviert die G1PK und stimuliert so über ein Anheben des G16P-Spiegels die Phosphoglucomutase. 5'-AMP, welches die G1PK gleichfalls aktiviert, wirkt gleichzeitig steigernd auf die Glykogenolyse, indem

es die Überführung der Phosphorylase a in die Phosphorylase b durch Hemmung der Phosphorylase-a-Phosphatase unterdrückt oder auch selbst die Phosphorylase b aktiviert (24). Die Hemmung der G1PK durch ATP, Citrat und Creatinphosphat stellen direkte Beziehungen zum Pasteur-Effekt her. Auf der Stufe des G1P wird durch die entsprechende Hemmung der G1PK die Einschleusung von Glykogen-Glucose in den Embden-Meyerhof-Abbau unterdrückt. Die Hemmung der G1PK erklärt sich aus dem Anstieg des ATP- bzw. Creatinphosph Spiegels, der dem Übergang vom anaeroben zum aeroben Zustand bzw. beim Muskel der Restitutionsphase, parallelgeht. Die Hemmung des Enzyms durch Citrat ist besonders interessant, weil mit steigendem Umsatz im Citratzyklus während der aeroben Restitutionsphase des Muskels möglicherweise auch ein Anstieg des extramitochondrialen Citrats erfolgt. Die Unterdrückung der Glykogenolyse, mit ansteigendem Spiegel des Creatinphosphats, ATP und Citrats ist nicht nur für die Restitutionsphase bedeutsam. Die gleichsinnige Steuerung von Phosphorylase und Phosphoglucomutase dient der Regulation des Substratflusses beim Übergang vom anaeroben zum aeroben Stoffwechsel und ermöglicht im weiteren Sinne die Umschaltung von kataboler auf anabole Stoffwechselleistung.

Die Wirksamkeit dieses Regelsystems ist besonders groß, weil die besprochene Steuerung der Glykogenolyse über die besonderen Eigenschaften der Fructose-6-Phosphat-Kinase direkt mit der Regulation des Substratflusses im glykolytischen Stoffwechselweg gekoppelt ist. Wie die G1PK wird auch die F6PK durch Protonen, ATP, Creatinphosphat und Citrat gehemmt und durch 5'-AMP, 3',5'-AMP, anorganisches Phosphat und Ammoniumionen aktiviert. Bemerkenswert ist der Befund, daß G16P, das Produkt der G1PK-Reaktion, selbst auch ein äußerst wirksamer positiver Effektor der F6PK ist (15, 21). Zellphysiologische Bedeutung dürfte besonders der Tatsache zukommen, daß die Aktivierungskonzentration für die F6PK im Bereich von 5 - 30 µmolar liegt (16). Diese Konzentrationen entsprechen aber gerade den G16P-Spiegeln in ruhenden bzw. tetanisch gereizten Muskel. Aus der gleichartigen Wirkung identischer Effektoren sowohl auf die G1PK als auch auf die F6PK ergibt sich ein Mechanismus synergistischer und synchroner Regulation von Glykogenolyse u Glykolyse. Für den Muskel, in dem die Glykogenolyse ganz offensichtlich den Hauptweg des Kohlenhydratabbaus zur Energiegewinnung darstellt (1, 2), ist dieser Mechanismus einer synergistischen Regulation von Glykogenolyse und Glykolyse überaus sinnvoll. Tatsächlich wird der vorgeschlagene Mechanismus einer synergistischen Kontrolle von Glykogenolyse und Glykolyse durch den Befund erhärtet, daß F6PK und G1PK ein und dasselbe Enzym sind.

Die bei der Reinigung der G1PK erhaltenen Resultate stützen in jeder Hinsicht

die Annahme, daß die Phosphorylierung von G1P zu G16P eine zusätzliche Eigenschaft der F6PK ist. Mit keiner der angewandten präparativen und analytischen Verfahren gelingt eine Trennung von G1PK- und F6PK-Aktivität. Kristallisierte F6PK (Präp. H 1063 in Tab. 2) zeigt das gleiche Verhältnis von G1PK/F6PK-Aktivität wie die weniger reinen und in verschiedenen Ansätzen aus Kaninchenmuskel gereinigten Präparationen der G1PK. Dieser Befund, wie auch die Tatsache, daß eine Trennung der beiden Enzymaktivitäten weder durch Ionenaustausch-Chromatographie noch durch Sedimentation im Schwerefeld möglich ist, spricht eindeutig für die Identität von G1PK und F6PK. Mit der Identifizierung der G1PK als einer Nebenaktivität der F6PK kann zugleich gezeigt werden, daß es sich bei dem von PALADINI und Mitarb. gereinigten Enzym nicht um eine spezifische G1PK, sondern offensichtlich auch um die F6PK gehandelt hat. Diese Aussage folgt aus der Tatsache, daß die im ungereinigten Muskelextrakt meßbare Aktivität der G1PK im Verhältnis zur Aktivität der F6PK keineswegs größer ist, als dem an der gereinigten bzw. kristallisierten F6PK bestimmten Aktivitätsverhältnis G1PK/F6PK von 1 : 150 entspricht. Die im Rohextrakt meßbare G1PK-Aktivität ist im Verhältnis zur F6PK sogar niedriger, als auf Grund dieses Quotienten erwartet werden kann. Dieser Befund erklärt sich aus methodischen Gründen. Die Aktivitätsbestimmung der G1PK im ungereinigten Muskelrohextrakt ist durch die Interferenz G16P-spaltender Enzyme erschwert und liefert im allgemeinen zu niedrige Meßwerte. Damit ist aber klar, daß im Muskel neben der F6PK ein weiteres Enzymprotein mit nennenswerter G1PK-Aktivität nicht vorliegen kann.

Der zuvor vorgeschlagene Mechanismus einer synergistischen Regulation von Glykogenolyse und Glykolyse wird schließlich umso wahrscheinlicher als nicht nur identische Effektoren gleichsinnig die Aktivitäten der G1PK und F6PK positiv oder negativ beeinflussen, sondern auch, weil G1PK und F6PK Aktivitäten ein und desselben Enzymproteins sind. Die durch die Wirkung der G1PK mögliche Regulation der Phosphoglucomutase-Aktivität steht freilich nicht nur im Dienste einer Steuerung der Glykogenolyse zum Zweck der Regulation des energieliefernden Stoffwechsels. Allein durch Kontrolle des Spiegels an aktiver Phosphorylase ist eine wirksame Regulation des Glykogenabbaus bereits möglich. Die zusätzliche Steuerung auf der Stufe des G1P schafft einen weiteren, unabhängigen Kontrollpunkt im Stoffwechsel. Er ist vielleicht weniger bedeutsam für den Muskel als für Gewebe mit bevorzugt anaboler Stoffwechselleistung. Die G16P-abhängige Regelung der Phosphoglucomutase-Aktivität schafft die Voraussetzung, Glykogenolyse und Glykolyse auch unabhängig voneinander zu steuern. Auf diese Weise besteht nämlich

die Möglichkeit, den Abfluß von G1P in die Glykolyse zu verhindern und damit das dem Glykogen entstammende G1P für Synthesewege bereitzustellen, die ihren Ausgang von dieser Substratzwischenstufe nehmen.

Ein wichtiges Problem im Hinblick auf die Effektor-abhängige Regulation der G1PK wird allerdings mit den hier berichteten Befunden nicht geklärt. Es betrifft den Mechanismus der Glykogensynthese. Voraussetzung für die Synthese des Glykogens ist die Bereitstellung von Glucose-1-Phosphat. Unabhängig davon, ob die Bildung von Glykogen auf der Grundlage von Gluconeogenese oder über die Phosphorylierung der mit dem Blut zugeführten Glucose erfolgt, gründet sich die Bereitstellung von G1P nach den bisherigen Erkenntnissen auf die von der Phosphoglucomutase katalysierte Umesterung von G6P zu G1P. Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Befunde bieten alle Voraussetzungen für ein Verständnis der Regulation bei der Umwandlung von G1P in G6P im Falle der Einschleusung von G1P in den glykolytischen Abbau. Die Hemmung der G1PK durch ATP, Creatinphosphat und Citrat wirft aber die Frage auf, wie bei hohem energetischen Potential der Zelle eine G16P-Bildung und damit die für die Glykogensynthese notwendige Umesterung von G6P zu G1P in der PGM-Reaktion gewährleistet wird. Eine endgültige Klärung dieser Frage ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich. Einerseits könnte vermutet werden, daß die für die Glykogenbildung erforderliche Bereitstellung von G1P über einen von der PGM-Reaktion und damit auch vom Spiegel des G16P unabhängigen Mechanismus erfolgt. Andererseits könnte ebenso eine von der Hemmung der G1PK durch ATP, Creatinphosphat und Citrat unabhängige G16P-Bildung erfolgen. Ansatzpunkte für einen solchen Mechanismus finden sich möglicherweise in der fehlenden Nucleotid-Spezifität der G1PK. Die in Abb. 11 gezeigte Abhängigkeit der G1PK-Aktivität von den Konzentrationen verschiedener Nucleosid-Triphosphate macht deutlich, daß eine Hemmung des Enzyms bevorzugt durch ATP hervorgerufen wird. ITP und GTP haben bei höheren Konzentrationen kaum einen hemmenden Effekt,und auch die Hemmung der G1PK durch UTP erfolgt erst bei höherer Konzentration als im Falle des ATP. Gerade im Hinblick auf die zentrale Stellung des UTP bei der Glykogensynthese stellt die unterschiedliche Hemmbarkeit durch ATP und UTP eine mögliche Erklärung dafür dar, daß die Wirkung der G1PK auch im Dienste der Glykogensynthese gewährleistet ist. Diese Funktion bleibt allerdings vorerst spekulativ und bedarf der weiteren experimentellen Klärung.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus Kaninchenmuskel wurde Glucose-1-Phosphat-Kinase isoliert und 150-fach angereichert. Das Enzym katalysiert die Reaktion:
   G1P + ATP = G16P + ADP
   G16P ist Cosubstrat der Phosphoglucomutase, so daß G1PK über den Spiegel des G16P die PGM-Aktivität reguliert.

2. Die hochgereinigte G1PK erwies sich als identisch mit der F6PK des Muskels. Mit keinem der angewandten präparativen und analytischen Verfahren gelang eine Trennung der beiden Enzym-Aktivitäten. Der Aktivitätsquotient F6PK/G1PK blieb während der Reinigung des Enzyms konstant und betrug in 9 verschiedenen Präparationen konstant 150/1. Aus Kaninchenmuskel kristallisierte F6PK zeigte den gleichen Aktivitätsquotienten.

3. Für die Aktivitätsbestimmung der G1PK wurden zwei spezifische und empfindliche Verfahren ausgearbeitet. Das eine Verfahren gründet sich auf den Nachweis des gebildeten ADP und das andere auf die Bestimmung des G16P. Grundlage für den zweiten Aktivitätstest ist die Stimulierung der PGM durch G16P. Mit Hilfe dieses Prinzips wird eine Methode zur Messung von G16P im standardisierten kinetischen Test angegeben.

4. Die Substrataffinitäten von einigen Zuckern und Zuckerphosphaten wurden untersucht und die Michaeliskonstanten bestimmt. Sie betragen für G1P $1,3 \times 10^{-2}$, für F1P $2,2 \times 10^{-3}$ und für F6P 3×10^{-5} Mol/Liter. Die Messungen erfolgten jeweils bei 0,2 mM ATP, 6 mM $MgCl_2$ und einem pH von 7,6.

5. G1PK ist nicht spezifisch für ATP. GTP, CTP, UTP, ITP können gleichfalls Reaktionspartner sein. Die Affinität des Enzyms zu den einzelnen Nucleosid-Triphosphaten ist unterschiedlich. Die scheinbaren Substratbindungskonstanten sind pH-abhängig und werden durch die G1P-Konzentration beeinflußt.

6. Die Nucleosid-Triphosphate wirken in höheren Konzentrationen hemmend auf die Enzymaktivität. Im physiologischen Konzentrationsbereich ist die Hemmung des Enzyms durch UTP und vor allem durch ATP von besonderem Interesse. Die ATP-Hemmung der G1PK ist pH-abhängig und wird auch durch den Spiegel des G1P beeinflußt. Bei pH 7,6 und 2 mM G1P erfolgt eine 50 %ige Hemmung des Enzyms durch 1,5 mM ATP. Bei pH 7,0 und gleich hoher G1P-Konzentration wird diese Hemmung bereits

durch 0,1 mM ATP erreicht. Die pH-Abhängigkeit der ATP-Hemmung erklärt sich aus einer Potenzierung der Hemmung durch fallendes pH. Die Hemmung der G1PK durch ATP findet eine Deutung in einer Erhöhung der scheinbaren Substratbindungskonstante für G1P.

7. Eine Potenzierung der ATP-Hemmung erfolgt gleichfalls durch Citrat und Creatinphosphat. Der Einfluß dieser negativen Effektoren auf die G1PK-Aktivität wurde in Abhängigkeit zu ihrer Konzentration untersucht.

8. Positive Effektoren der G1PK sind 5'-AMP, 3',5'-AMP, IMP, Ammoniumionen, G16P und anorganisches Phosphat. In Abhängigkeit zur Konzentration wurde ihr Einfluß näher am Beispiel von 5'-AMP und 3',5'-AMP untersucht.

9. Die Wirkung der positiven Effektoren besteht in einer Aufhebung der ATP-Hemmung, so daß die positiven Effektoren der G1PK als Deinhibitoren bezeichnet werden können. Die deinhibierende Wirkung zeigt sich auch im Falle der durch pH und Citrat bzw. Creatinphosphat potenzierten ATP-Hemmung des Enzyms.

10. Die Regulierbarkeit der G1PK-Aktivität durch positive und negative Effektoren rechtfertigt die Einordnung der G1PK in die Gruppe der allosterisch kontrollierten Enzyme. Die Tatsache, daß die G1PK eine Nebenaktivität der Fructose-6-Phosphat-Kinase ist und daß beide Enzymaktivitäten durch identische positive und negative Effektoren reguliert werden, ist Grundlage für einen neu postulierten Mechanismus der synergistischen Kontrolle für Glykogenolyse und Glykolyse. Die Bedeutung dieses Kontrollmechanismus besteht darin, daß zwei verschiedene, wenn auch funktionell zusammengehörige Stoffwechselwege durch die allosterischen Eigenschaften ein und desselben Enzymproteins reguliert werden. Die Funktion der G1PK als eines Regulatorenzyms der Phosphoglucomutase schafft darüber hinaus die Möglichkeit, den Stoffwechsel der Glykogenolyse auf der Stufe des G1P und unabhängig von der Steuerung des Phosphorylase-Systems zu kontrollieren. Da G16P, das Reaktionsprodukt der G1PK, nicht nur Cosubstrat der Phosphoglucomutase-Reaktion, sondern zugleich ein äußerst wirksamer Effektor der Fructose-6-Phosphat-Kinase ist, bietet die von der G1PK katalysierte Reaktion auch die Möglichkeit einer positiven "feed forward" Kontrolle der Fructose-6-Phosphat-Kinase.

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas Herrn Professor Dr. Dirk PETTE herzlich danken. Er half mir durch viele Anregungen und unterstützte meine Arbeit auf das Großzügigste.

Herrn Professor Dr. Dr. Theodor BÜCHER danke ich für die Möglichkeit in seinem Hause zu arbeiten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Pette, D., "Energieliefernder Stoffwechsel des Muskels unter zellphysiologischem Aspekt", Symposium über progressive Muskeldystrophie, Herausgeber E. Kuhn, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966).

2. Schimrick K., Mertens H.G., Ricker K., Führ J., Eyer P. und D. Pette "Mc Ardle Syndrom (Myopathie bei fehlender Muskelphosphorylase)", Klin. Wochenschrift 45. Jahrgang Heft 1, 1-17 (1967).

3. Najjar V. and M.E. Pullman, "The Occurrence of a Group Transfer Involving Enzyme (phosphoglucomutase) and Substrate", Science 119, 631 (1954).

4. Leloir L.F., Trucco R.E., Cardini C.E., Paladini A. and R. Caputto, Arch. Biochem. 19, 339 (1948).

5. Hashimoto T. and H. Yoshikawa, "The Presence of D-Glucose 1,6 diphosphate hydrolyzing Enzymes", The J. of Biochemistry (Tokyo) 59, 427 (1966).

6. Paladini A., Caputto R., Leloir L.F., Trucco R.E. and C.E. Cardini, "The Enzymatic Synthesis of G16P", Arch. Biochem. 23, 55 (1949)

7. Bücher Th., Luh W. und D. Pette, Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch-pathologisch-chemische Analyse, ed. 10, Vol. VI/A 292 ff. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964)

8. Hogeboom G.H. and E.L. Knuff, "Sedimentation Behaviour of Proteins and Other Materials in a Horizontal Preparative Rotor", J. Biol. Chem. 210, 733 (1954).

9. Martin R. G. and B. N. Ames,
"A Method for Determining the Sedimentation Behaviour of Enzymes, Application for Protein Mixtures",
J. Biol. Chem. 236, 1372 (1961).

10. Nolte, J. und D. Pette in Vorbereitung

11. Guerritore A., D. Pette e Th. Bücher,
"Estrazione e purificazione della fosfofruttocinasi di muscolo",
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. XXXVIII, 1763 (1962).

12. Hofer W. and D. Pette,
"The Complex Nature of Phosphofructokinase - A Nucleic Acid Containing Enzyme",
Life Sciences 4 1591 (1965).

13. Hofer W. and D. Pette,
"On the Functional Significance of the Nucleic Acid-Protein Complex of Phosphofructokinase",
Life Sciences 4 1597 (1965).

14. Hofer W. and D. Pette,
"The Role of the Nucleic Acid in Phospho-fructokinase as an "Enzyme Modulator",
Life Sciences, 5, 199 (1966).

15. Pette D. and W. Hofer,
"Some Properties of Fructose-6-Phosphate-Kinase from Rabbit Skeletal Muscle",
Control of Energy Metabolism,
Academic Press Inc. New York, 71 (1965).

16. Hofer W. und D. Pette in Vorbereitung.

17. Lardy H.A. and Parkes R.E.,
"Enzymes: Units of Biological Structure and Function",
Academic Press Inc. New York 584 (1956).

18. Viñuela E., Salas M.L. and A. Sols,
"End-Product Inhibition of Yeast Phosphofructo-kinase by ATP", Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 140 (1963).

19. Uyeda K. and E. Racker,
"Regulatory Mechanisms in Carbohydrate Metabolism VII Hexokinase and Phosphofructokinase",
J. Biol. Chem. 240, 4682 (1965).

20. Passoneau J.V. and O.H. Lowry,
"Phosphofructokinase and the Pasteur-Effect",
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 10 (1962).

21. Pette D. und W. Hofer,
"Fructose-6-Phosphat-Kinase und Glucose-1-Phosphat-Kinase, ihre regulierende Wirkung im Kohlenhydratstoffwechsel",
Ztschr. Klin. Chem. 3, 208 (1965).

22. Mansour T.E. and J.M. Mansour,
"Effects of Serotonin and 3',5'-AMP on Phosphofructokinase from the Liver Fluke (fasciola hep.)",
J. Biol. Chem. 237, 629 (1962).

23. Passoneau J.V. and O.H. Lowry,
"Phosphofructokinase and the Control of the Citric Acid Cycle",
Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 372 (1963).

24. Cori C.F. and G.F. Cori,
"Crystalline Muscle Phosphorylase III Kinetics"
J. Biol. Chem. 151, 39 (1943).

LEBENSLAUF

Am 6. Juni 1942 wurde ich als Sohn des Oberstabsarztes Dr. Dr. Hermann E y e r und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Decker, in München geboren.
Von Ostern 1948 bis Ostern 1952 besuchte ich die Volksschule in Bonn. Nach bestandener Aufnahmeprüfung verbrachte ich meine Gymnasialzeit von 1952 - 1959 im Humanistischen Gymnasium "Kollegium Josephinum" in Bonn und von 1959 - 1961 im humanistischen "Wilhelmsgymnasium" in München, wo ich 1961 absolvierte.

Im Wintersemester 1961/62 begann ich in München mit dem Medizinstudium. Am 25. Februar 1964 legte ich das Physikum in München mit der Note "sehr gut" ab. Im Sommersemester 1964 studierte ich ein Semester in Freiburg. Nach München zurückgekehrt, begann ich im Herbst 1964 mit meiner Doktorarbeit bei Herrn Professor Dr. D. Pette im Physiologisch-Chemischen Institut. Nach 11 Semestern beendete ich am 28. Juni 1967 das Medizinstudium mit dem Staatsexamen in München, das ich mit der Note "sehr gut" bestand.